PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

E. BÜNNING-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

45. BAND, 5. HEFT

MIT 38 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 10. JUNI 1955)

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

Planta (Berl.)

Preis DM 17.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik.

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler.* Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald als möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä., von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim,* oder an

Professor Dr. Otto Renner, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

---

45. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 5. Heft

Seite

Libbert, E., Nachweis und chemische Trennung des Korrelationshemmstoffes und seiner Hemmstoffvorstufe 405

Bartels, F., Cytologische Studien an Leukoplasten unterirdischer Pflanzenorgane. Mit 25 Textabbildungen 426

Reznik, H., Über den histochemischen Nachweis der an der Verholzung beteiligten β-Glucosidasen. Mit 3 Textabbildungen 455

Bosian, G., unter Mitarbeit von A. Ensgraber, Über die Vollautomatisierung der CO_2-Assimilationsbestimmung und zur Methodik des Küvettenklimas. Mit 10 Textabbildungen 470

Planta, Bd. 45, S. 405—425 (1955).

Aus dem Institut für Botanik der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. Voderberg).

NACHWEIS UND CHEMISCHE TRENNUNG DES KORRELATIONSHEMMSTOFFES UND SEINER HEMMSTOFFVORSTUFE.

Von

Eike Libbert.

(Eingegangen am 18. März 1955.)

1. Einleitung.

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß Wachstumsvorgänge in der Pflanze hormonal gesteuert werden. Während man aber bis vor kurzem geneigt war, allein oder überwiegend dem Auxin eine Bedeutung für diese Steuerung beizumessen, mehren sich in letzter Zeit die Hinweise darauf, daß bei der Steuerung vieler Wachstumsvorgänge pflanzeneigene Hemmstoffe dem Auxin gleichberechtigt zur Seite treten.

Einen solchen pflanzeneigenen HS[1], den Snowschen Korrelationshemmstoff (Snow 1937, Libbert 1954a), habe ich (Libbert 1954b, 1955a) bei *Pisum sativum* nachweisen und extrahieren können. Diesem HS kommt eine physiologische Bedeutung hinsichtlich des Knospenwachstums (Snow, Libbert, s. oben) und wahrscheinlich auch hinsichtlich des Wurzelwachstums (Libbert 1955b) zu. Der Korrelations-HS wandert in der Pflanze gleicherweise akro- und basipetal, entsteht unter Auxineinwirkung, reagiert neutral und ist kein Aldehyd. Über seine Bildung in der Pflanze habe ich (1954b, 1955a) folgende Hypothese vertreten: Der Korrelations-HS entsteht aus einer HS-Vorstufe, die ihrerseits in der Wurzel gebildet und von dieser an den Sproß geliefert wird. Die Umwandlung HS-Vorstufe → Korrelations-HS erfolgt unter Einwirkung von Auxin. Es sei erwähnt, daß diese Vorstellung ausschließlich auf Grund von Experimenten an etiolierten Pflanzen entwickelt wurde.

Wenn diese Vorstellung richtig ist, müssen die aus Sprossen bzw. Wurzeln etiolierter Pflanzen extrahierbaren HSe wenigstens zum Teil verschieden sein. Hier liegt der Ansatzpunkt für die vorliegende Untersuchung. Es soll versucht werden, Unterschiede im chemischen Verhalten der HSe aus Sprossen bzw. Wurzeln aufzufinden, auf Grund dieser Unterschiede Korrelations-HS und HS-Vorstufe (falls die beiden nebeneinander vorliegen) auf chemischem Wege zu trennen und getrennt voneinander nachzuweisen. Daß der HS-Vorstufe vermutlich ebenfalls eine

[1] Hemmstoffe werden im folgenden mit HS bezeichnet.

(schwächere) hemmende Wirkung zukommt, habe ich bereits (1955a) erwähnt.

Ausgehend von der 1954 (b) und 1955 (a) ausgesprochenen Vermutung, daß es sich bei HS-Vorstufe und Korrelations-HS um ungesättigte Laktone handeln könne, sollen die aufgefundenen chemischen Eigenschaften der extrahierten HSe auch benutzt werden, um zu prüfen, ob diese Ansicht weiter aufrechterhalten werden kann.

2. Methodik.

Versuchsobjekt war *Pisum sativum*, Sorte Senator, von der Firma Heinemann (Erfurt). Die Pflanzen wurden entweder im thermokonstanten Dunkelraum (27° C) oder im Warmhaus (20—26° C, vor direktem Sonnenlicht geschützt) in Töpfen mit Kristallquarzsand gezogen. Nach etwa 10 Tagen wurde extrahiert.

Zur Extraktion wurden die ausgewachsenen Sproßteile zerschnitten, die Wurzeln gut gewaschen, oberflächlich getrocknet, zerschnitten und gewogen. Noch nicht ausgewachsene Sproßteile wurden verworfen. Auf 1 g Frischsubstanz wurden 4 cm³ peroxydfreier Äther verwendet. Die Extraktion geschah bei +2 bis +4° C und dauerte 24 Std. Die extrahierten Pflanzenteile wurden mit Äther gewaschen und Extraktions- und Waschäther zum Rohextrakt vereinigt. Dieser wurde nach BOYSEN JENSEN (1941, Methode II) in eine neutrale und eine saure Fraktion zerlegt; die letztere wurde verworfen.

Bei chlorophyllhaltigen Pflanzenteilen wurde das Trennungsverfahren zuweilen etwas variiert, um gleichzeitig das Chlorophyll mit zu entfernen: Der Rohextrakt wurde mit 15 cm³ Aqua dest. versetzt, der Äther abdestilliert und so die HSe in Aqua dest. überführt. Die wäßrige Lösung wurde filtriert, der unlösliche Rückstand mit 12 cm³ Aqua dest. gewaschen, das Waschwasser ebenfalls filtriert und alles Wasser vereinigt. Dann wurde dieses mit Glucose gesättigt, mit 3 cm³ 8%iger $NaHCO_3$-Lösung alkalisch gemacht und zweimal mit je 30 cm³ Äther ausgeschüttelt. Die Glucoselösung (= saure Fraktion) wurde verworfen, die ätherische Lösung (= neutrale Fraktion) weiter verarbeitet.

Es wurden also nur die neutralen HSe untersucht.

Die neutrale Fraktion (ätherisch) wurde bei den einzelnen Versuchen in verschiedener Weise weiterbehandelt, wie in den einzelnen Abschnitten des Näheren ausgeführt wird. Zum Schluß der Behandlung wurden die HSe in destilliertes Wasser überführt und in dieser wäßrigen Lösung getestet. Die Menge des destillierten Wassers war so bemessen, daß sie $^1/_3$ des Frischgewichtes der extrahierten Pflanzenteile betrug, eine solche HS-Lösung wurde als $^3/_1$-Lösung bezeichnet.

Die HS-Bestimmung in der wäßrigen Lösung geschah in einem Keimungstest. Ich habe (1955a) gezeigt, daß sich der Korrelations-HS im Wuchsstofftest, im „Knospentest" und im Keimungstest nachweisen läßt. Da für diese Arbeit eine große Zahl von Testungen durchgeführt werden mußte, wurde die Testmethode verwendet, die den geringsten Zeitaufwand erfordert.

Je 100 *Lepidium*-Samen (Ernte 1953) wurden in einer Petrischale (8 cm ⌀) auf 16 g Kristallquarzsand zur Keimung ausgelegt. Der Quarzsand war mit 5 cm³

der zu testenden wäßrigen HS-Lösung getränkt. Stets wurden je 2 Schalen mit derselben HS-Lösung beschickt. Die Keimung erfolgte im Dunkelthermostaten bei 27° C. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn in den Kontrollschalen (Aqua dest., ohne HS) etwa 70—85% der Samen gekeimt waren, das war (in Abhängigkeit von der Jahreszeit) nach 11—14 Std der Fall.

Die statistische Sicherung erfolgte in der 1954 (b, S. 293) von mir beschriebenen Weise. Nach dieser Rechnung ist im ungünstigsten Falle (d. i. in der Nähe der 50%igen Keimung) bei einer Zahl von 200 Samen je Testlösung eine Differenz von 16% Keimung (d. h. also 32 Samen) zwischen zwei zu vergleichenden Testlösungen mit $P < 0{,}0027$ statistisch gesichert. Eine Differenz von 16% Keimung wurde also in dieser Untersuchung als signifikant betrachtet und auf die Wiedergabe der betreffenden P-Werte verzichtet. Im allgemeinen war jedoch die gefundene Keimungsdifferenz weit größer.

Jeder Versuch wurde wenigstens einmal wiederholt. Hier wird meist nur jeweils ein Versuch wiedergegeben.

In einigen Versuchen (Abschnitt 8) wurden die HSe nicht im Keimungstest, sondern im Knospentest bzw. im variierten Moewusschen Kressewurzeltest untersucht.

Im allgemeinen erfolgte die Testung am Tage nach der Extraktion. Zuweilen wurden die Extrakte einige Tage aufbewahrt. Vorversuche (Tabelle 1) hatten gezeigt, daß die aufgefundenen HSe sowohl in wäßriger als in ätherischer Lösung als auch als Trockensubstanz (neutrale Fraktion auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft, nach 10d wieder in Äther 30 min aufgenommen) über wenigstens 10 Tage bei + 2 bis + 4° C aufbewahrt werden können, ohne auch nur einen Teil ihrer Wirksamkeit einzubüßen.

Tabelle 1. *Haltbarkeit des Hemmstoffes aus etiolierten Sprossen. 1 Versuch. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Zeit der Testung	Testlösung	HS aufbewahrt	Keimung %
1 Std nach Extraktion	Aqua dest	—	71
	HS	—	34
10 Std nach Extraktion	Aqua dest	—	69
	HS	in wäßriger Lösung	34
	HS	als Trockensubstanz	33
	HS	in ätherischer Lösung (neutrale Fraktion)	39
	HS	in ätherischer Lösung (Rohextrakt)	34

Bei jedem Versuch lief eine „Gesamt-HS-Kontrolle" mit, das sind 2 Schalen, die alle mit Äther extrahierbaren neutralen HSe in wäßriger Lösung enthielten (ein Teil der ätherischen neutralen Fraktion mit Aqua dest. versetzt, Äther abdestilliert, filtriert, eingeengt, der andere Teil weiterverarbeitet). Die durch diese Gesamt-HS-Lösung erzielte

Hemmung war nicht von Tag zu Tag gleich stark, sondern schwankte jahreszeitlich. Das kann auf Schwankungen des HS-Gehalts der Erbsenpflanzen beruhen, aber auch auf Empfindlichkeitsschwankungen des Testobjekts (vgl. MAYER 1953 für Salatsamen, für *Lepidium* gelten ähnliche Erscheinungen, wie ich später berichten werde). Es können also stets nur die Keimungswerte ein und desselben Versuches direkt miteinander verglichen werden.

3. Löslichkeit der HSe in organischen Lösungsmitteln.

Die Untersuchung der Löslichkeit geschah auf folgende Weise: Die neutrale Fraktion wurde auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde in etwa 50 cm³ des betreffenden Lösungsmittels aufgenommen (30 min geschüttelt). Dann wurde filtriert, noch einmal mit demselben Lösungsmittel nachgewaschen und das Wasch-Lösungsmittel ebenfalls filtriert. Dem gesamten Filtrat wurden 20 cm³ Aqua dest. zugesetzt und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad abdestilliert. Die zurückbleibende wäßrige Lösung wurde filtriert und auf dem Wasserbad auf $^1/_3$ des Frischgewichts der extrahierten Pflanzenteile eingeengt.

Tabelle 2. *Löslichkeit des HS aus etiolierten Sprossen. Extraktionsdauer 30 min. Siehe Text. 6 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Gesamt-HS	Lösungsmittel	Löslicher HS
1	78	**31**	Äthyläther	**35**
			Äthanol	**37**
2	79	**37**	Methanol	*55*
			Aceton	**36**
3	81	**27**	Chloroform	*54*
4	83	**29**	Petroläther	*54*
5	76	**30**	Benzol	73
6	80	**35**	Wasser	*63*

Bei Verwendung eines Lösungsmittels, das mit Wasser mischbar ist (Alkohole, Aceton) wurde nach Filtration der alkoholischen (bzw. Aceton-) HS-Lösung nicht Aqua dest. zugesetzt, sondern zur Trockene eingedampft. Die Trockensubstanz wurde in Äther (30 min) aufgenommen (Äther erweist sich als ideales Lösungsmittel: Tabellen 2, 5, 6) und erst aus diesem in Aqua dest. überführt.

Wurde die Löslichkeit in Wasser untersucht, konnte das Lösungsmittel (Aqua dest.) nach Filtration sofort eingeengt werden.

Zuerst wurde die Löslichkeit der **HSe aus etiolierten Sprossen** untersucht, und zwar in Äther, 96%igem Äthanol, Methanol, Aceton, Chloroform, Petroläther, Benzol und Wasser (Tabelle 2[1]).

Der Sproß-HS ist also gut löslich in Äther, Äthanol und Aceton, gar nicht in Benzol. In Methanol, Chloroform, Petroläther und Wasser geht in 30 min nur ein Teil des HS in Lösung. Es fragt sich, ob bei längerer Extraktionsdauer etwa ein größerer Teil des HS von den zuletzt genannten Extraktionsmitteln gelöst werden kann (Tabelle 3).

Es wurde also die Extraktionsdauer auf 24 Std erhöht. Zu Beginn und zu Ende dieser Zeit wurde je 30 min geschüttelt, in der Zwischenzeit bei 27° C aufbewahrt.

[1] In allen Tabellen bedeuten: fettgedruckte Zahlen: HS nachweisbar; kursiv gedruckte Zahlen: HS nur zum Teil nachweisbar; gewöhnliche Zahlen: kein HS nachweisbar.

Es zeigt sich, daß bei längerer Extraktionszeit der Sproß-HS auch in Methanol, Chloroform und Petroläther vollständig in Lösung geht. Die Löslichkeit in Benzol bleibt jedoch gleich Null, und auch in Wasser wird keine vollständige Lösung erreicht. Eine Wasserlöslichkeit aller in den Gesamt-HS-Kontrollen nachweisbaren HSe muß jedoch vorhanden sein, eben auf Grund ihrer Nachweisbarkeit in diesen Kontrollen, also in wäßriger Lösung. Es wurde also versucht, mit heißem Wasser (bzw. auch heißem Benzol) den HS restlos aus der Trockene aufzunehmen (Tabelle 4).

Tabelle 3. *Löslichkeit des HS aus etiolierten Sprossen. Extraktionsdauer 24 Std. Siehe Text. 3 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Gesamt-HS	Lösungsmittel	Löslicher HS
1	70	42	Methanol	42
2	81	27	Chloroform	27
3	79	40	Petroläther	44
			Benzol	79
			Wasser	*63*

Die Trockensubstanz wurde mit kochendem Wasser (bzw. Benzol) übergossen und anschließend 15 min auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wurde auf 15° abgekühlt, filtriert und in der üblichen Weise weiter verfahren.

Tabelle 4. *Löslichkeit des HS aus etiolierten Sprossen in heißen Lösungsmitteln. Extraktionsdauer 15 min (heiß). Siehe Text. 1 Versuch. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Aqua dest.	Gesamt-HS	Lösungsmittel	Löslicher HS
75	44	Heißwasser	47
		Heißbenzol	77

Es wird also mit heißem Wasser eine vollständige Lösung des Sproß- HS erreicht, mit heißem Benzol gar keine. *Der Sproß-HS ist also in Benzol absolut unlöslich, in allen anderen Lösungsmitteln vollständig löslich, wenn auch in Methanol, Chloroform, Petroläther und besonders in Wasser die Löslichkeit schlecht ist.*

Bei dem Versuch, das Pflanzenmaterial nicht mit Äther, sondern von vornherein mit den anderen organischen Lösungsmitteln zu extrahieren (24 Std), erhielt ich prinzipiell gleiche Ergebnisse: Unlöslichkeit in Benzol, Löslichkeit in Äthanol, Methanol, Petroläther und Chloroform (Aceton und Wasser wurden nicht untersucht).

Die **HSe aus Wurzeln etiolierter Pflanzen** wurden in der gleichen Weise untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5 zeigt, daß sich bei etiolierten Pflanzen die HSe aus Wurzeln hinsichtlich aller untersuchten Lösungsmittel (mit Ausnahme des Benzols) ebenso verhalten wie die HSe aus Sprossen: Vollständige Lösung in 30 min in Äther, Äthanol und Aceton, in 24 Std auch in Methanol, Chloroform und Petroläther, bei Wasser erst vollständige Lösung in der Hitze (vgl. auch Tabelle 7).

Tabelle 5. *Löslichkeit der HSe aus Wurzeln etiolierter Pflanzen. Siehe Text. 6 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Gesamt-HS	Lösungsmittel	Extraktionsdauer	Extraktionsart	Löslicher HS
1	78	24	Äthyläther	30 min	kalt	20
2	73	32	Äthanol	30 min	kalt	31
			Methanol	30 min	kalt	*40*
			Methanol	24 Std	kalt	30
			Aceton	30 min	kalt	32
3	83	47	Chloroform	30 min	kalt	*62*
			Chloroform	24 Std	kalt	45
			Petroläther	30 min	kalt	*63*
4	79	41	Petroläther	24 Std	kalt	44
5	76	26	Benzol	30 min	kalt	*48*
4	79	41	Benzol	24 Std	kalt	*59*
			Wasser	24 Std	kalt	*60*
6	92	51	Benzol	15 min	heiß	*73*
			Wasser	15 min	heiß	52

In Benzol (sowohl 30 min, als auch 24 Std, als auch heiß) *geht jedoch bei Wurzeln ein Teil der HSe in Lösung, ein anderer Teil bleibt ungelöst.* Bei Sprossen blieb aller HS ungelöst. (Der in Benzol unlösliche Teil kann anschließend mit Äther gelöst und nachgewiesen werden, s. die Tabellen 11, 13—16.) Es liegt also in Wurzeln etiolierter Pflanzen ein HS vor, der in etiolierten Sprossen nicht nachweisbar ist (weitere Beweise s. Abschnitt 5), und der sich (u. a.) durch seine Löslichkeit in Benzol von dem in Sprossen vorliegenden HS unterscheidet. Damit ist also ein *Unterschied im HS-Gehalt zwischen Sproß und Wurzel* aufgedeckt. Wenn die in der Einleitung dargelegte Hypothese, daß die Wurzel Bildungsort einer HS-Vorstufe sei, richtig ist, dann dürfte diese Vorstufe in der benzollöslichen HS-Fraktion vorliegen.

Des weitern wurden die Untersuchungen auf die **HSe aus Sprossen bzw. Wurzeln grüner Pflanzen** ausgedehnt. Die mit derselben Methode erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 6 dargestellt.

In der Tabelle 6 wurden nicht die absoluten Keimungszahlen wiedergegeben, sondern der Hemmungsquotient

$$q = \frac{K - HS_v}{K - HS_g},$$

wobei K = Keimung in der Wasserkontrolle, HS_g = Keimung in der Gesamt-HS-Kontrolle, HS_v = Keimung in der untersuchten HS-Lösung ist. q = 1 bedeutet also eine Hemmung, die ebenso stark ist wie die in der Gesamt-HS-Kontrolle, q = 0 bedeutet gar keine Hemmung. Eine q-Differenz von 0,1 ist in keiner Weise signifikant, deshalb wurde auch q jeweils auf volle Zehntel aufgerundet.

Aus Tabelle 6 geht hervor, daß die Löslichkeitsverhältnisse der HSe aus Sprossen bzw. Wurzeln grüner Pflanzen untereinander gleich sind und auch denen der HSe aus Wurzeln etiolierter Pflanzen gleichen. Das

Tabelle 6. *Löslichkeit der HSe aus Sprossen bzw. Wurzeln grüner Pflanzen. Siehe Text. 17 Versuche. Zahlen: Hemmungsquotient.*

Lösungsmittel	Extraktionsdauer	Extraktionsart	Sprosse		Wurzeln	
			Versuch	Hemmungsquotient	Versuch	Hemmungsquotient
Äthyläther . . .	30 min	kalt	1	**1,0**	9	**1,0**
Äthanol	30 min	kalt	2	**1,0**	10	**1,0**
Methanol	30 min	kalt	3	*0,6*	11	*0,6*
Methanol	24 Std	kalt		**1,0**	12	**1,0**
Aceton	30 min	kalt	2	**1,1**	11	**1,0**
Chloroform . . .	30 min	kalt	4	*0,5*	13	*0,6*
Chloroform . . .	24 Std	kalt	1	**1,1**		**1,1**
Petroläther . . .	30 min	kalt	5	*0,7*	14	*0,4*
Petroläther . . .	24 Std	kalt		**1,0**		**0,9**
Benzol	30 min	kalt	6	*0,5*	15	*0,6*
Benzol	24 Std	kalt	7	*0,5*	16	*0,5*
Wasser	24 Std	kalt	1	*0,5*		*0,5*
Benzol	15 min	heiß	8	*0,6*	17	*0,4*
Wasser	15 min	heiß		**0,9**		**0,9**

ist in der Tabelle 7 übersichtlich zusammengestellt. Das heißt: *In etiolierten Sprossen ist nur 1 HS (benzolunlöslich!) vorhanden. In grünen Sprossen sowie in Wurzeln ist außer diesem HS noch ein 2. HS (benzollöslich).* Wenn in der benzollöslichen Fraktion die HS-Vorstufe vorliegt, wird diese also nicht nur, wie bisher angenommen, in den Wurzeln gebildet, sondern auch in grünen Pflanzenteilen.

Tabelle 7. *Löslichkeit der HSe aus Sprossen und aus Wurzeln etiolierter bzw. grüner Pflanzen. Zeichenerklärung: +++ in 30 min kalt völlig löslich; ++ in 24 Std kalt völlig löslich; + kalt nur zum Teil löslich, heiß in 15 min völlig löslich; ± heiß und kalt nur zum Teil löslich; — völlig unlöslich.*

Lösungsmittel	Etiolierte Pflanzen		Grüne Pflanzen	
	Sprosse	Wurzeln	Sprosse	Wurzeln
Äthyläther . .	+++	+++	+++	+++
Äthanol . . .	+++	+++	+++	+++
Methanol . .	++	++	++	++
Aceton . . .	+++	+++	+++	+++
Chloroform .	++	++	++	++
Petroläther .	++	++	++	++
Benzol . . .	—	±	±	±
Wasser . . .	+	+	+	+

Die HSe aller untersuchten Pflanzenteile (auch die etiolierter Sprosse) sind in 30 min (kalt) nicht völlig löslich in Methanol, Chloroform, Petroläther und Wasser. Es fragt sich, welchem der beiden HSe die Eigenschaft der Schwerlöslichkeit zukommt. Auf jeden Fall dem benzolunlöslichen HS, denn in etiolierten Sprossen ist dieser allein nachzuweisen. Ob aber dem benzollöslichen HS dieselbe Eigenschaft zukommt, sollen die folgenden Versuche entscheiden (Tabelle 8).

Die (ätherische) neutrale Fraktion aus grünen Sprossen wurde zur Trokkene eingedampft, in Benzol aufgenommen und filtriert. Auf diese Weise wurde der benzolunlösliche HS entfernt. Dann wurde wieder zur Trockene eingedampft und mit Methanol, Chloroform, Petroläther oder Wasser aufgenommen und weiter verfahren, wie auf S. 408 beschrieben.

Tabelle 8. *Löslichkeit des Benzol-HS aus grünen Sprossen. Extraktionsdauer 30 min (kalt). Siehe Text. 2 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Benzol-HS gesamt	Lösungsmittel	Löslicher Benzol-HS
1	77	43	Methanol	43
			Chloroform	42
			Petroläther	41
2	72	46	Wasser	45

Aus Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß der benzollösliche HS in Methanol, Chloroform, Petroläther und Wasser gut löslich ist.

4. Adsorbierbarkeit der HSe an Aktivkohle.

Diese wurde folgendermaßen untersucht: Die neutrale Fraktion wurde in 20 cm³ Aqua dest. überführt, die wäßrige Lösung filtriert und mit einer Spatelspitze Aktivkohle 15 min geschüttelt. Dann wurde filtriert, mehrfach gut nachgespült, auf dem Wasserbad eingeengt und mit *Lepidium* getestet.

Tabelle 9. *Adsorbierbarkeit der HSe aus Sprossen und aus Wurzeln etiolierter bzw. grüner Pflanzenteile an Aktivkohle. Siehe Text. 4 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Extrahierte Pflanzenteile		Gesamt-HS	HS nach Kohlebehandlung
1	71	Etiolierte Pflanzen	Sprosse	37	70
2	64		Wurzeln	33	66
3	65	Grüne Pflanzen	Sprosse	34	65
4	91		Wurzeln	57	90

Tabelle 9 zeigt, daß *alle HSe* (aus allen untersuchten Pflanzenteilen) *an Aktivkohle adsorbierbar* sind. Das gilt also für den benzolunlöslichen HS und für den benzollöslichen HS.

5. Beständigkeit der HSe gegen Säure und Lauge.

Es wurde zunächst die Beständigkeit der gesamten neutralen HS-Fraktion gegen Säure (5%ige HCl) und gegen Lauge (1 mol NaOH) untersucht (Tabelle 10).

Die (ätherische) neutrale Fraktion wurde in Wasser überführt, die wäßrige Lösung filtriert. Je 20 cm³ der wäßrigen HS-Lösung wurden entweder mit 30 cm³ Aqua dest., 30 cm³ $8^1/_3$%iger HCl oder 30 cm³ $6^2/_3$%iger NaOH versetzt, so daß also die HCl-Konzentration in der wäßrigen Lösung 5% betrug bzw. die NaOH-Konzentration 1 mol. Alle Teile wurden 2 Std am Rückflußkühler auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wurde mit NaOH bzw. HCl neutralisiert und alle drei Teile (wasser-, säure- bzw. alkalibehandelt) mit Aqua dest. auf das gleiche Volum

Tabelle 10. *Beständigkeit der HSe aus Sprossen und aus Wurzeln etiolierter bzw. grüner Pflanzen gegen NaOH bzw. HCl. Siehe Text. 4 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Extrahierte Pflanzenteile		Gesamt-HS	HS, wasserbehandelt	HS, alkalibehandelt	HS, säurebehandelt
1	80	Etiolierte Pflanzen	Sprosse	**24**	**23**	79	77
2	59		Wurzeln	**27**	**24**	59	*39*
3	79	Grüne Pflanzen	Sprosse	**40**	**39**	78	*58*
4	88		Wurzeln	**47**	**49**	89	*67*

gebracht. Anschließend wurde mit Glucose gesättigt und die HSe zweimal mit je 50 cm³ Äther ausgeschüttelt. Die Glucose-Lösung wurde verworfen, die ätherische HS-Lösung in Aqua dest. überführt, die wäßrige Lösung filtriert, eingeengt und getestet.

Tabelle 10 zeigt zunächst, daß ein zweistündiges Erhitzen auf dem Wasserbad (ohne Säure oder Lauge) die HSe nicht beeinflußt, und daß sich die HSe quantitativ aus wäßriger Lösung ausschütteln lassen. Weiter ist ersichtlich, daß *alle HSe*, gleich ob aus etiolierten oder grünen Sprossen, aus Wurzeln etiolierter oder grüner Pflanzen, *durch Alkali vollständig zerstört* werden. Hinsichtlich der Säure verhalten sich die HSe aus etiolierten Sprossen einerseits und aus allen übrigen untersuchten Pflanzenteilen andererseits verschieden: Der HS aus etiolierten Sprossen wird vollständig, die HSe aus grünen Sprossen bzw. aus Wurzeln werden nur zum Teil abgebaut.

Da (Abschnitt 3) in etiolierten Sprossen nur ein HS (benzolunlöslich), in grünen Sprossen und in Wurzeln außer diesem noch ein zweiter (benzollöslich) nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß der benzolunlösliche HS säurelabil und der benzollösliche HS säurestabil sei. Das wurde geprüft (Tabelle 11).

Die (ätherische) neutrale Fraktion wurde zur Trockene eingedampft und mit 50 cm³ Benzol aufgenommen. Nach Filtration wurde der unlösliche Rückstand mit Benzol gründlich ausgewaschen und das Waschbenzol ebenfalls filtriert. Unlöslicher Rückstand und Filter wurden dann mit 50 cm³ Äther extrahiert und ebenfalls mit Äther gut ausgewaschen. Auf diese Weise wurden zwei Fraktionen erhalten, eine Benzol-Fraktion, die den benzollöslichen HS, und eine ätherische

Tabelle 11. *Beständigkeit des benzollöslichen und des benzolunlöslichen HS aus Sprossen bzw. Wurzeln grüner Pflanzen gegen HCl. Siehe Text. 2 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Extrahierte Pflanzenteile	Hemmstoff	Unbehandelt	Säurebehandelt
1	81	Sprosse	Nichtbenzol-HS	**54**	78
			Benzol-HS	**50**	**52**
2	74	Wurzeln	Nichtbenzol-HS	**51**	76
			Benzol-HS	**49**	**53**

Fraktion, die den benzolunlöslichen HS enthielt. Beide Fraktionen wurden durch Abdestillation des Lösungsmittels in Aqua dest. überführt und anschließend der HCl-Behandlung (s. oben) unterworfen.

Tabelle 11 liefert die Bestätigung der oben ausgesprochenen Vermutung: *Der benzolunlösliche HS* (in den Tabellen als Nichtbenzol-HS bezeichnet) *ist säurelabil, der benzollösliche HS* (in den Tabellen als Benzol-HS bezeichnet) *ist säurestabil.* Das ist auch ein weiterer Beweis für die Existenz zweier HSe in grünen Sprossen und in Wurzeln, dagegen nur eines HS in etiolierten Sprossen.

6. Beständigkeit der HSe gegen H_2O_2.

Zunächst wurden wieder die gesamten neutralen HS-Fraktionen untersucht (Tabelle 12).

Die (ätherische) neutrale Fraktion wurde in Aqua dest. überführt, die wäßrige Lösung filtriert. 20 cm³ der wäßrigen Lösung wurden mit 1 cm³ H_2O_2 (30%ig, Perhydrol) versetzt und anschließend 20 min am Rückflußkühler auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wurde zur Trockene eingedampft, 10 cm³ Aqua dest. zugesetzt, ein zweitesmal zur Trockene eingedampft und 10 cm³ Aqua dest. zugesetzt, und ein drittesmal zur Trockene eingedampft. Dann wurde in Äther aufgenommen, in Wasser überführt, die wäßrige Lösung filtriert, eingeengt und getestet. Gleichzeitig wurde eine identische Behandlung mit weiteren 20 cm³ wäßriger neutraler Fraktion vorgenommen, aber ohne Zusatz von H_2O_2.

Tabelle 12. *Beständigkeit der HSe aus Sprossen und aus Wurzeln etiolierter bzw. grüner Pflanzen gegen H_2O_2. Siehe Text. 4 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Extrahierte Pflanzenteile		Gesamt-HS	HS 3mal zur Trockene	HS, H_2O_2-behandelt
1	81	Etiolierte Pflanzen	Sprosse	**59**	**59**	**80**
2	73		Wurzeln	—	**34**	*55*
3	82	Grüne Pflanzen	Sprosse	**39**	**40**	*66*
4	83		Wurzeln	**50**	**51**	*71*

Aus Tabelle 12 ist zunächst zu entnehmen, daß alle HSe das dreimalige Eindampfen zur Trockene überstehen. Des weiteren erweist sich aller HS aus etiolierten Sprossen als H_2O_2-labil, die HSe aus grünen Sprossen und aus Wurzeln nur zum Teil. Wieder liegt die Vermutung nahe, daß der benzolunlösliche HS empfindlich, der benzollösliche HS beständig gegen H_2O_2 ist. Daß diese Ansicht unrichtig ist, zeigt Tabelle 13.

Die neutrale Fraktion wurde, wie auf S. 413 beschrieben, in eine Benzol-Fraktion und eine Äther-Fraktion (die die benzolunlöslichen Bestandteile enthält) geteilt und dann beide Fraktionen mit H_2O_2 behandelt.

Der benzolunlösliche HS ist (Tabelle 13) *H_2O_2-labil*, und auch *die Benzolfraktion* büßt ihre hemmende Wirkung durch die H_2O_2-Behandlung *zum (größeren) Teil* ein (grüne Sprosse, Wurzeln). Das kann auf dreierlei Weise erklärt werden: 1. Der Abbau des benzollöslichen HS durch H_2O_2

Tabelle 13. *Beständigkeit des benzollöslichen und des benzolunlöslichen HS aus Sprossen und aus Wurzeln grüner bzw. etiolierter Pflanzen gegen H_2O_2. Siehe Text. 5 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Versuch	Aqua dest.	Extrahierte Pflanzenteile		HS-Konzentration	Hemmstoff	Unbehandelt	H_2O_2-behandelt
1	68	Grüne Pflanzen	Sprosse	3/1	Nichtbenzol-HS	**32**	67
2	88		Wurzeln			**44**	87
1	68	Grüne Pflanzen	Sprosse	3/1	Benzol-HS	**40**	*58*
2	88		Wurzeln			**52**	*75*
3	90	Grüne Pflanzen	Sprosse	6/1	Benzol-HS	**45**	*73*
4	76		Wurzeln			**33**	*58*
5	79	Etiolierte Pflanzen	Wurzeln			**35**	*62*

kann unvollständig sein. 2. Die Behandlung des benzollöslichen HS mit H_2O_2 kann zu einem Abbauprodukt führen, das selbst noch keimungshemmend wirkt. 3. Es kann in der Benzolfraktion ein weiterer HS vorliegen. Im nächsten Abschnitt kann gezeigt werden, daß die 3. Möglichkeit zutrifft.

7. Der HS-Gehalt der Pflanze nach operativen Eingriffen.

Ich habe (1954b, 1955a) aus etiolierten Sprossen den Snowschen Korrelations-HS (vgl. Einleitung) extrahieren können. Da in etiolierten Sprossen keine benzollöslichen HS vorhanden sind, muß der Korrelations-HS benzolunlöslich sein. — Des weiteren folgerte ich, daß aus der Wurzel etiolierter Pflanzen eine HS-Vorstufe stamme. Da in Wurzeln zusätzlich zu dem auch in etiolierten Sprossen nachweisbaren HS noch ein benzollöslicher HS vorliegt, kann es sich bei diesem um die HS-Vorstufe handeln. Es läßt sich sehr leicht zeigen, ob diese Arbeitshypothese richtig ist: Der benzollösliche HS (= HS-Vorstufe?) soll nach den Ergebnissen dieser Untersuchung in Wurzeln und in grünen Pflanzenteilen entstehen. Wenn man also eine im Halbschatten aufgewachsene Pflanze (deren Blätter intensiv grün sind, deren Sproßachse dagegen nur schwach grün ist) entblättert, sollte der Gehalt an benzollöslichem HS im Sproß zurückgehen. Wenn man diese entblätterte Pflanze nun noch dekapitiert, wird sie auxinarm, dadurch sollte die Umwandlung der HS-Vorstufe in den Korrelations-HS herabgemindert werden, infolgedessen müßte sich die HS-Vorstufe im Sproß anreichern. Noch durchschlagender müßte der Erfolg einer Dekapitation in einem etiolierten Sproß sein: Es müßte auch zur Anreicherung der HS-Vorstufe (von der Wurzel geliefert) kommen; und unter der Voraussetzung, daß HS-Vorstufe = benzollöslicher HS sei, müßte sich dieser, der in etiolierten Sprossen sonst nie gefunden werden konnte, in dekapitierten

etiolierten Sprossen nachweisen lassen. Beide Nachweise (grüne Sprosse und etiolierte Sprosse) wurden versucht (Tabelle 14 und 15, Versuch 1).

Eine Gruppe von grünen Pflanzen wurde (als Kontrolle) intakt belassen Eine zweite Gruppe wurde aller bereits ergrünten Blätter beraubt, und 4 Tage lang wurden täglich alle sich entfaltenden Blätter entfernt. Eine dritte Gruppe wurde dekapitiert, alle Blätter und alle Knospen wurden entfernt, und 4 Tage lang wurden alle neuentstehenden Ersatzknospen fortgenommen. Nach 4 Tagen wurde extrahiert.

Bei etiolierten Pflanzen unterblieb die Entblätterung, es gab also nur zwei Gruppen: Intakte und dekapitierte Pflanzen.

Die nach 4 Tagen gewonnenen Extrakte wurden in der üblichen Weise verarbeitet und (wie auf S. 413 beschrieben) in eine benzollösliche und eine benzolunlösliche Fraktion getrennt. Diese wurden getestet.

Tabelle 14. *Hemmstoffgehalt grüner Pflanzen nach Amputation der Blätter, oder der Blätter und Sproßspitzen, oder der Wurzeln. Testung 4 Tage nach der Amputation. 5 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Extrahierte Pflanzenteile	Versuch	Aqua dest.	Nicht-benzol-HS	Benzol-HS, gesamt	Versuch	Aqua dest.	Benzol-HS, H_2O_2-stabil
Sprosse intakter Pflanzen. .	1	75	**42**	**40**	4	69	**57**
Sprosse entblätterter Pflanzen			**45**	**69**			69
Sprosse entblätterter und dekapitierter Pflanzen . . .			70	**39**			70
Sprosse intakter Pflanzen. .	2	72	**42**	**46**	5	74	**55**
Sprosse entwurzelter Pflanzen			**45**	**53**			**64**
Wurzeln intakter Pflanzen. .	3	74	**49**	**46**			
Wurzeln entblätterter Pflanzen			**49**	**44**			
Wurzeln entblätterter und dekapitierter Pflanzen . . .			*66*	**47**			

Versuch 1 (Tabelle 14) zeigt, daß *bei grünen Pflanzen nach einer Entblätterung der benzollösliche HS fast völlig verschwindet* (die verbleibende Differenz ist nicht signifikant). Eine entblätterte grüne Pflanze verhält sich also wie eine etiolierte Pflanze: Es ist nur benzolunlöslicher HS nachzuweisen. *Nach einer Dekapitation* (sowohl entblätterter grüner Pflanzen: Tabelle 14, Versuch 1, als auch etiolierter Pflanzen: Tabelle 15, Versuch 1) kehrt sich das HS-Verhältnis um: Es *ist fast oder gar kein benzolunlöslicher HS nachzuweisen, dagegen viel benzollöslicher HS. Damit dürfte bewiesen sein, daß der benzolunlösliche HS der Korrelations-HS, der benzollösliche HS die Vorstufe ist*, und daß unter Auxineinwirkung eine Umwandlung Vorstufe → HS erfolgt. (Ich konnte in den vorhergehenden Arbeiten die Sproßspitze hinsichtlich ihres Einflusses auf den HS-Gehalt durch β-Indolylessigsäure ersetzen).

Aus der Tatsache, daß bei grünen Pflanzen nach einer Entblätterung zwar die nachweisbare Menge an HS-Vorstufe kleiner wird, nicht aber

Tabelle 15. *Hemmstoffgehalt etiolierter Sprosse nach Amputation der Sproßspitze oder der Wurzeln. Testung 4 Tage nach der Amputation. 3 Versuche. Zahlen: Keimung in Prozent.*

Extrahierte Pflanzenteile	Versuch	Aqua dest.	Nichtbenzol-HS	Benzol-HS, gesamt	Versuch	Aqua dest.	Benzol-HS, H_2O_2-stabil
Sprosse intakter Pflanzen. .	1	82	**52**	82	3	79	78
Sprosse dekapitierter Pflanzen			82	**62**			79
Sprosse intakter Pflanzen. .	2	77	**57**	75			
Sprosse entwurzelter Pflanzen			78	75			

die Menge des Korrelations-HS (Tabelle 14, Versuch 1), geht hervor, daß *für die Bildung des Korrelations-HS nicht die HS-Vorstufe limiting factor* ist, sondern das Auxin; es verbleibt nach der Entblätterung im Sproß noch genügend (wohl hauptsächlich aus der Wurzel stammende) HS-Vorstufe, um die Korrelations-HS-Bildung aufrechtzuerhalten, jedoch zu wenig, um dem Nachweis im Keimungstest noch zugänglich zu sein (ebenso wie bei etiolierten Sprossen).

Wird dagegen eine Pflanze ihrer sämtlichen Quellen für die HS-Vorstufe beraubt, wird diese zum limiting factor, und die Korrelations-HS-Konzentration nimmt ab: Eine Entwurzelung etiolierter Pflanzen führt zu einem geringeren Gehalt an benzolunlöslichem HS (Tabelle 15, Versuch 2; in diesem Versuch ließ sich ausnahmsweise nach der Entwurzelung gar kein Korrelations-HS mehr nachweisen).

Die Pflanzen der Versuche 2 (Tabelle 14 und 15) wurden ausgegraben und in Bechergläser mit Leitungswasser gestellt. Bei der Hälfte der Pflanzen wurden die Wurzeln entfernt, neuentstehende Adventivwurzeln wurden täglich weggeschnitten. Nach 4 Tagen wurde extrahiert.

Bei grünen Pflanzen (Tabelle 14, Versuch 2) wirkt sich eine Entwurzelung nicht stark auf den HS-Gehalt aus: Die Konzentration des Korrelations-HS bleibt unverändert, die Konzentration der HS-Vorstufe nimmt insignifikant ab. Das ist verständlich, denn grünen Pflanzen verbleibt nach einer Entfernung einer Quelle für die HS-Vorstufe (der Wurzel) noch genügend (aus den Blättern stammende) HS-Vorstufe, um einen normalen HS-Haushalt aufrechtzuerhalten.

Der *Einfluß einer Dekapitation auf den HS-Haushalt erstreckt sich bis in die Wurzel* (Tabelle 14, Versuch 3): Auch dort nimmt der Gehalt an Korrelations-HS nach der Dekapitation ab (vgl. Libbert 1955b). Durch eine Entblätterung wird in der Wurzel kein Effekt erzielt; das war zu erwarten, da die Wurzel selbst zu viel HS-Vorstufe besitzt, um von der aus den Blättern stammenden HS-Vorstufe in irgendeiner Weise abhängig zu sein.

Die Dekapitationsversuche erlauben auch einen Rückschluß darauf, ob in der benzollöslichen HS-Fraktion zwei HSe, ein H_2O_2-stabiler und

ein H_2O_2-labiler, vorliegen (vgl. S. 415). Die in der Benzolfraktion vorliegende HS-Vorstufe nimmt nach einer Dekapitation zu (s. oben). Versuch 4 (Tabelle 14) und Versuch 3 (Tabelle 15) zeigen, daß das für den H_2O_2-stabilen HS nicht zutrifft: Eine Dekapitation hat auf seine hemmende Wirkung gar keinen Einfluß. *Damit wird gezeigt, daß die HS-Vorstufe H_2O_2-labil ist, und daß der (gleicherweise benzollösliche) H_2O_2-stabile HS unabhängig von dieser existiert* und nicht etwa nur ein Umwandlungsprodukt der HS-Vorstufe ist oder ein (infolge unvollständigen Abbaus zurückbleibender) Rest der HS-Vorstufe.

Nach einer Entblätterung bzw. Entwurzelung (Tabelle 14, Versuch 4 und 5) nimmt dagegen die Konzentration des H_2O_2-stabilen HS ab, ein Zeichen, daß auch dieser aus der Wurzel stammt und aus grünen Blättern. Allerdings muß zu diesen Versuchen bemerkt werden, daß ihr Ergebnis (infolge der geringen Menge oder der geringen Wirksamkeit des H_2O_2-stabilen HS) nicht signifikant ist.

8. Die Wirksamkeit der nachgewiesenene HSe im Knospentest und im Wurzeltest.

Alle in dieser Untersuchung bisher durchgeführten HS-Nachweise wurden mit einem Keimungstest geführt. Es ergeben sich die Fragen: Welche der drei nachgewiesenen HSe beeinflussen das Knospenwachstum und (im Zusammenhang mit der 1955b postulierten Bedeutung des nachgewiesenen HS-Systems für das Wurzelwachstum) welche der HSe beeinflussen das Wurzelwachstum?

Es wurden benzolunlöslicher HS, benzollöslicher HS und H_2O_2-stabiler HS aus Sprossen und aus Wurzeln grüner Pflanzen im Knospentest (LIBBERT 1955a, mikroskopische Messung) und im (leicht variierten) MOEWUSschen Kressewurzeltest (1949) geprüft (Tabelle 16 und 17).

In den Tabellen werden nicht, wie 1955a, die Knospenlängen zu Versuchsende angegeben, sondern der Knospenzuwachs während des Versuches. Die Knospenausgangslänge (etwa 1,60 mm) wurde an einer Kontrollgruppe vor Versuchsbeginn ermittelt. Je Testlösung wurde eine Petrischale (⌀ 10 cm) mit 30—40 isolierten Knoten verwandt.

Der Kressewurzeltest wurde in der Weise variiert, daß der Versuch nicht auf Filterpapier (in Petrischalen) durchgeführt wurde, sondern auf Kristallquarzsand (in Petrischalen), der mit der Testlösung getränkt war. Es wurden zwei Petrischalen (⌀ 8 cm) mit je 10—15 Wurzeln je Testlösung verwandt.

Tabelle 16 zeigt, daß *nur der benzolunlösliche HS, also der Korrelations-HS, signifikant knospenhemmend* wirkt ($P < 0{,}0002$), die Hemmung durch den benzollöslichen HS, also die HS-Vorstufe, ist nicht signifikant ($P = 0{,}18$ für HS aus Sprossen, $P = 0{,}06$ für HS aus Wurzeln).

Tabelle 16. *Wirkung des benzolunlöslichen bzw. des benzollöslichen HS aus Sprossen und aus Wurzeln grüner Pflanzen im Wurzeltest (17½ Std) und im Knospentest (48 Std). Zahlen: Wurzelwachstum bzw. Knospenwachstum in mm. 2 Versuche.*

Versuch	Test	Extrahierte Pflanzenteile	Aqua dest.	Nichtbenzol-HS	Benzol-HS, gesamt
1	Wurzeltest	Sprosse	13,50 ± 0,365	10,75 ± 0,185	9,95 ± 0,17
		Wurzeln	13,06 ± 0,365	10,78 ± 0,385	8,20 ± 0,45
2	Knospentest	Sprosse	0,79 ± 0,08	0,31 ± 0,06	0,64 ± 0,08
		Wurzeln		—	0,58 ± 0,07

Tabelle 17. *Wirkung des H_2O_2-stabilen HS aus Sprossen und aus Wurzeln grüner Pflanzen im Wurzeltest (17½ Std) und im Knospentest (72 Std). Zahlen: Wurzelwachstum bzw. Knospenwachstum in mm. 2 Versuche.*

Versuch	Test	Extrahierte Pflanzenteile	Aqua dest.	Benzol-HS, H_2O_2-stabil
1	Wurzeltest	Sprosse	13,31 ± 0,36	14,45 ± 0,48
		Wurzeln		14,55 ± 0,47
2	Knospentest	Sprosse	1,54 ± 0,11	1,47 ± 0,09
		Wurzeln		1,35 ± 0,09

Das Wurzelwachstum dagegen wird sowohl durch den Korrelations-HS als durch die HS-Vorstufe gehemmt (Tabelle 16). Die Hemmung durch die HS-Vorstufe ist sogar noch stärker (Konzentrationseffekt, vgl. Abschnitt 11). Während die Konzentration an Korrelations-HS in Sprossen und Wurzeln gleich ist, liegt in Wurzeln mehr HS-Vorstufe vor als in Sprossen ($P = 0{,}0008$).

Der H_2O_2-stabile HS (Tabelle 17) wirkt dagegen weder wurzel- noch knospenhemmend: Im Knospentest kommt es zu einer nicht signifikanten Hemmung ($P = 0{,}6$ bzw. 0,17 für HS aus Sprossen bzw. aus Wurzeln), im Wurzeltest zu einer nicht signifikanten Förderung ($P = 0{,}055$ bzw. 0,04 für HS aus Sprossen bzw. aus Wurzeln).

9. Modellversuche mit Cumarin.

Es wurden, wie in der Einleitung erwähnt, in vorausgegangenen Mitteilungen Anhaltspunkte dafür gefunden, daß die aufgefundenen HSe ungesättigte Laktone seien. Jetzt liegen einige Angaben über das chemische Verhalten der HSe vor, so daß ein Vergleich mit dem Verhalten eines ungesättigten Laktons, des Cumarins, durchgeführt werden kann.

Die Löslichkeitsversuche geben wenig Anhaltspunkte: Cumarin ist zwar in den hier zur Untersuchung gekommenen Lösungsmitteln verschieden gut löslich, aber selbst in einer physiologisch stark wirksamen Konzentration wie 10^{-4}(g/cm³) ist es in allen diesen Substanzen löslich.

Cumarin ist quantitativ an Kohle adsorbierbar, ist beständig gegen HCl, empfindlich gegen NaOH und H_2O_2. Alle diese Eigenschaften wurden im Keimungstest überprüft (Tabelle 18).

Tabelle 18. *Adsorbierbarkeit von Cumarin an Aktivkohle, Beständigkeit von Cumarin gegen HCl, NaOH und H_2O_2. Siehe Text. Zahlen: Keimung in Prozent. 4 Versuche.*

Versuch	Aqua dest.	Cumarin-Konzentration	Cumarin behandelt mit	Keimung in Cumarin	
				unbehandelt	behandelt
1	93	10^{-4}	Kohle	4	89
2	90	10^{-4}	HCl	1	1
			NaOH	1	27
3	79	10^{-5}	NaOH	26	76
4	59	10^{-5}	H_2O_2	13	62

Die Methode war dieselbe wie bei den entsprechenden Versuchen mit den extrahierten HSen, mit Ausnahme der Versuche mit H_2O_2: Hier wurde, da Cumarin sublimiert, nicht zur Trockene eingedampft, sondern nach der H_2O_2-Behandlung viermal auf etwa 1 cm³ eingeengt und jedesmal anschließend 10 cm³ Aqua dest. zugesetzt. Nach dem letzten Einengen wurde mit Äther ausgeschüttelt, getrennt, die ätherische Lösung in Wasser überführt und getestet. Auch auf diese Weise ließ sich das zugesetzte H_2O_2 entfernen, andererseits übersteht Cumarin diese Behandlung, aber ohne H_2O_2-Zugabe, vollständig.

Cumarin und HS-Vorstufe verhalten sich also in allen untersuchten Eigenschaften gleich. Der Korrelations-HS nimmt nur durch seine Benzolunlöslichkeit, Schwerlöslichkeit in einigen anderen Lösungsmitteln und durch seine Säureempfindlichkeit eine Sonderstellung ein. Alles in allem spricht dieses Ergebnis für die Identität zumindest der HS-Vorstufe mit einem ungesättigten Lakton.

Von der Alkali- und H_2O_2-Empfindlichkeit des Cumarins kann man sich auch auf fluorescenzoptischem Wege überzeugen: Cumarin fluoresciert in wäßriger Lösung (10^{-3}) nur sehr schwach (violett). Nach einer Alkalibehandlung tritt sehr starke grüne, nach einer H_2O_2-Behandlung sehr starke blaue Fluorescenz auf.

10. Fluorescenzoptisches Verhalten der untersuchten HSe.

Der eben erwähnte Fluroescenzumschlag einer Cumarinlösung nach Alkali- bzw. Perhydrolbehandlung gab Veranlassung, auch die HS-Extrakte in dieser Richtung zu untersuchen.

Dabei wurde von einer wäßrigen 30/1 HS-Lösung ausgegangen (neutrale Fraktion von 300 g grünen Sprossen, überführt in 10 cm³ Aqua dest.). Diese besaß eine deutliche Fluorescenz von blauer, leicht violettstichiger Farbe. Eine *HCl-Behandlung ließ die Fluorescenz unverändert, NaOH-Behandlung dagegen führte zu Intensitäts- und Farbwechsel:* Die Intensität wurde wesentlich verstärkt, die Farbe schlug von violettblau nach blaugrün um. Eine *Behandlung* mit H_2O_2 minderte die Intensität der Fluorescenz wesentlich, ein *Farbumschlag* erfolgte ebenfalls nach grünlichblau.

Dann wurden Benzolfraktion und benzolunlösliche Fraktion (in wäßriger Lösung) getrennt untersucht. Die Fluorescenz der Benzolfraktion (Farbe und Intensität) war dieselbe wie die der gesamten neutralen Fraktion, auch der Einfluß einer NaOH- bzw. H_2O_2-Behandlung war derselbe wie dort. Die benzolunlösliche Fraktion fluorescierte nur schwach (Farbe wie die gesamte neutrale Fraktion), die Intensität der Fluorescenz wurde weder durch Alkali- noch durch H_2O_2-Behandlung beeinflußt, lediglich ein leichter Farbumschlag nach grünlichblau wurde durch die NaOH-Behandlung erreicht.

Anschließend wurde derselbe Versuch mit einer 30/1 neutralen Fraktion aus etiolierten Sprossen durchgeführt. Das Ergebnis war dasselbe, wenn auch die Fluorescenz aller Fraktionen (mit Ausnahme der benzolunlöslichen Fraktionen) von geringerer Intensität war als bei Extrakten aus grünen Sprossen.

Diese Ergebnisse lassen die Frage offen, ob die Fluorescenz der *Pisum*-Extrakte wenigstens teilweise von den HSen herrührt. *Dafür* spricht das gleichartige Verhalten der HSe und der fluorescierenden Substanzen (und des Cumarins) gegen NaOH und gegen H_2O_2. *Dagegen* spricht die starke Fluorescenz der Benzolfraktion aus etiolierten Sprossen. Es wird jedoch angenommen (Abschnitt 11), daß die HS-Vorstufe erst in hoher Konzentration physiologisch wirksam ist. Darum ist es möglich, daß die HS-Vorstufe in etiolierten Sprossen in einer Konzentration vorliegt, die dem fluorescenzoptischen Nachweis (HS-Konzentration 30/1!) noch zugänglich ist, nicht aber dem Nachweis im Keimungstest (HS-Konzentration 3/1). *Die HSe können also am Zustandekommen der Fluorescenz durchaus beteiligt sein.* Dann gäben die Tatsachen, daß die benzolunlösliche Fraktion nur schwach fluoresciert, und daß durch HCl-Behandlung keine Änderung der Fluorescenz erreicht wird, einen Hinweis darauf, daß der Korrelations-HS entweder nicht fluoresciert oder in wesentlich geringerer Konzentration vorliegt als die HS-Vorstufe. Ich halte das letztere für wahrscheinlicher.

11. Diskussion der Ergebnisse und Literatur.

Die vorangegangenen Arbeiten (Libbert 1954b, 1955a) hatten zu der Erkenntnis geführt, daß in der Pisum-Pflanze ein HS-System vorliegt, das unter Auxineinwirkung aktiviert wird. Es wurde angenommen, daß eine HS-Vorstufe in der Wurzel gebildet, an den Sproß weitergeleitet und dort unter Auxineinwirkung zum Korrelations-HS aktiviert wird. Nun liegt der getrennte Nachweis von Korrelations-HS und HS-Vorstufe vor (vgl. auch die theoretischen Erörterungen in Abschnitt 7). Die dabei gewonnenen Erfahrungen zwingen zu einigen Abänderungen der genannten Anschauung.

Zunächst erfolgt die *Bildung der HS-Vorstufe* bei etiolierten Pflanzen zwar nur in der Wurzel, *bei grünen Pflanzen*, also im Licht, offensichtlich *auch in den Blättern* (s. Abschnitt 7). Es muß also bei grünen Pflanzen nicht nur die Wurzel, sondern auch das Blatt (unabhängig von seiner Auxinabgabe) am Zustandekommen der korrelativen Knospenhemmung beteiligt sein. (Die Richtigkeit dieser Ansicht werde ich demnächst mit Auxin-Knospenhemmungsversuchen an beblätterten bzw. blattlosen grünen Pflanzen unter Beweis stellen; die Versuche stehen kurz vor dem Abschluß.) Ich habe bereits 1954 (b, S. 311), veranlaßt durch die Ergebnisse SNOWS (1939), die Möglichkeit erwähnt, daß assimilierende Blätter ebenso wie die Wurzel die korrelative Hemmung verstärken. Damit finden auch viele Ergebnisse DOSTÁLS (z. B. 1909, 1926, 1939) ihre Erklärung. Auch MEINL und v. GUTTENBERG (1954) nehmen eine HS-Bildung im Laubblatt an[1].

Des weiteren erfolgt die *HS-Aktivierung*, d. h. die Umwandlung HS-Vorstufe → Korrelations-HS, vermutlich *nicht nur im Sproß, sondern auch in der Wurzel:* Der Korrelations-HS läßt sich in allen untersuchten Pflanzenteilen nachweisen. Das ist nicht verwunderlich, da auch in der Wurzel die beiden zur Bildung des Korrelations-HS notwendigen Komponenten, nämlich HS-Vorstufe und Auxin, nebeneinander vorliegen. Das eröffnet die Möglichkeit, daß das Wurzelwachstum vom Auxin über das aufgefundene HS-System beeinflußt wird (LIBBERT 1955 b).

Gehen wir jetzt auf die physiologische Wirksamkeit von HS-Vorstufe und Korrelations-HS ein. Die Knospen sind die einzigen Organe, die vom Korrelations-HS unvergleichlich stärker gehemmt werden als von der HS-Vorstufe, im Keimungstest wirken beide etwa gleich stark, im Wurzelwachstumstest wirkt sogar die HS-Vorstufe stärker. Wie kann da die Berechtigung erhalten bleiben, die „HS-Vorstufe" als „Vorstufe", nicht als HS zu bezeichnen? Ich halte die relativ starke Wirksamkeit der HS-Vorstufe für einen ausgesprochenen Konzentrationseffekt: *Die HS-Vorstufe dürfte überall in weit höherer Konzentration vorliegen als der ungleich wirksamere Korrelations-HS.* Dafür liegen Anhaltspunkte vor: In grünen Sprossen ist die HS-Vorstufe nicht limiting factor für die Bildung von Korrelations-HS: Wenn durch Entblätterung die Konzentration der HS-Vorstufe im Sproß soweit gemindert wird, daß sich diese im Keimungstest nicht mehr nachweisen läßt, bleibt trotzdem die Bildung des Korrelations-HS unbeeinflußt. Es werden also (in Wurzeln und in grünen Sprossen) nur geringe Mengen der vorhandenen Vorstufe zum Korrelations-HS umgewandelt und aktiviert. In etiolierten Sprossen läßt sich im Keimungstest gar keine HS-Vorstufe nachweisen,

[1] Den weiteren Folgerungen MEINL und v. GUTTENBERGS (1954) kann ich nicht zustimmen. Das werde ich in der oben in Aussicht gestellten, in Arbeit befindlichen Untersuchung experimentell belegen.

trotzdem muß sie in einem für die Korrelations-HS-Bildung ausreichenden Maße zur Verfügung stehen.

Eine Alternative wäre allerdings, daß in etiolierten (und in entblätterten grünen) Sprossen gar keine HS-Aktivierung stattfände, sondern gleich der Korrelations-HS, nicht die Vorstufe, von der Wurzel an den Sproß abgegeben würde. Ich halte das für unwahrscheinlich: Dann müßte bei etiolierten Pflanzen eine Aufhebung der korrelativen Hemmung durch Dekapitation auf dem Umweg über eine Minderung des Auxingehalts der Wurzel angenommen werden, und der Auxingehalt der Wurzel ist zwar durch eine Dekapitation des Sprosses zu beeinflussen, aber doch bei weitem nicht so stark wie etwa der Auxingehalt des Sprosses. Es wird jedoch noch nachzuweisen sein, ob die HS-Vorstufe in der Pflanze besser geleitet wird oder der Korrelations-HS, auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse des Korrelations-HS (schlechte Löslichkeit im Wasser, keine Löslichkeit in Benzol) ist das erstere anzunehmen. Das ist auch theoretisch zu folgern: Es müßte sonst der Einfluß der Wurzel auf das Knospentreiben dekapitierter Pflanzen weit größer sein, als er tatsächlich beobachtet wird.

Auch die Fluorescenzversuche geben einen Anhalt dafür, daß die Konzentration an HS-Vorstufe in der Pflanze weit höher ist als die Konzentration des Korrelations-HS.

Es sei nun versucht, die von mir nachgewiesenen HSe mit anderen, aus der Literatur bekannten, pflanzeneigenen HSen zu vergleichen. Dabei möchte ich von dem aufgefundenen H_2O_2-stabilen HS absehen, denn erstens habe ich (Abschnitt 7) gezeigt, daß diesem in bezug auf die korrelative Hemmung keine Bedeutung zukommt, und zweitens sind die durch diesen HS erzielten Effekte zu schwach, um mit Sicherheit Aussagen über sein chemisches Verhalten machen zu können.

HS-Vorstufe und Korrelations-HS sind nicht mit dem mehrfach beschriebenen „inaktiven Wuchsstoff" (Voss 1939) identisch, denn dieser ist H_2O_2-stabil (z. B. Voss 1939, Pohl 1951, Tegethoff 1951). Auch eine Identität mit dem HS, der zusammen mit dem Auxin den „inaktiven Wuchsstoff" bildet, liegt nicht vor, denn dieser ist erstens alkalistabil (Pohl 1951) und läßt sich zweitens nicht mit organischen Lösungsmitteln aus wäßriger Lösung ausschütteln (Tegethoff 1951).

H_2O_2-labile HSe wurden mehrfach in Kartoffelknollen und -kraut nachgewiesen (Baumeister 1951, Meyer 1950). Ob es sich zum Teil um dieselben HSe handelt wie die hier beschriebenen, läßt sich nicht sagen. In Kartoffelknollen wies auch Hemberg (z. B. 1949a) sowohl saure als auch neutrale HSe nach, die sowohl äther- als auch wasserlöslich sind. Hemberg mißt diesen HSen auch eine Bedeutung für die Ruheperiode der Kartoffelknospen bei, allerdings zeigte er 1952, daß in dieser Beziehung nur die sauren HSe von Bedeutung sind. Auch in Fraxinus-Knospen konnte Hemberg (1949b) HSe nachweisen, die in Beziehung zur Ruheperiode stehen sollen. Es muß aber mit Hemberg (1947) eine klare Unterscheidung getroffen werden zwischen der Ruheperiode aller Knospen einer Pflanze (die von Hemberg vorwiegend

untersucht wurde) und der Apikaldominanz (die von den hier untersuchten HSen beeinflußt wird).

LARSEN (1939) wies im Extrakt aus Tomatenfrüchten zwei neutrale HSe nach, von denen der eine gut, der andere schlecht in Wasser löslich war. Allerdings darf wohl kaum der HS-Haushalt einer Frucht mit dem einer wachsenden Pflanze verglichen werden. — Aus Pisum-Pflanzen wurden von RIPPEL (1939) HSe extrahiert, die das Wachstum von Saccharomyces hemmen, und die nicht trockenbeständig sein sollen.

Die von VOGT (1951) aus Getreidewurzeln extrahierten HSe sind mit den hier aufgefundenen nicht identisch: Sie sind ausnahmslos in Äther schwer löslich und gegen H_2O_2 beständig.

Schließlich sei noch an den von STEWART (1939) aus Kotyledonen und Blättern von Raphanus extrahierten HS erinnert, der (wie die hier beschriebenen HSe) neutral reagiert, und der bei der Hydrolyse Auxin ergibt, also jedenfalls in Beziehung zum Auxinhaushalt steht, möglicherweise in ähnlicher Art, wie es für den Korrelations-HS angenommen wird.

Und damit sind wir beim Kernpunkt der weiteren Fragestellung: Auf welche Weise das Auxin die Umwandlung der HS-Vorstufe in den Korrelations-HS reguliert. Die in dieser Untersuchung aufgedeckte Möglichkeit, HS und HS-Vorstufe voneinander zu trennen und getrennt zu verarbeiten, gibt den Ansatzpunkt zur Bearbeitung dieser Frage.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. In ätherischen Extrakten aus Pisum-Pflanzen wurden folgende Hemmstoffe nachgewiesen, die alle trocken- und hitzebeständig sind und sich aus wäßriger Lösung mit Äther ausschütteln lassen:

a) Der „*Korrelations-HS*". Gut löslich in Äther, Äthanol und Aceton, weniger gut in Methanol, Chloroform und Petroläther, *unlöslich in Benzol*. — Adsorbierbar an Aktivkohle, H_2O_2-labil, alkalilabil, *säurelabil*. — *Wirksam* im Keimungstest, im Wurzelwachstumstest und *im Knospentest*. — *Nachweisbar* in Wurzeln, *in etiolierten* und in grünen *Sprossen*. — Entsteht unter Auxineinwirkung aus einer „HS-Vorstufe".

b) Die „*HS-Vorstufe*". *Gut löslich in* Äther, Äthanol, Methanol, Aceton, Chloroform, Petroläther, *Benzol* und Wasser. — Adsorbierbar an Aktivkohle, H_2O_2-labil, alkalilabil, *säurestabil*. — Wirksam im Keimungstest und im Wurzelwachstumstest, *unwirksam im Knospentest*. — *Nachweisbar* in Wurzeln und in grünen Sprossen, *nicht in etiolierten Sprossen*. — Bildung in Wurzeln und in grünen Blättern.

c) *Ein weiterer HS* geringerer Aktivität. Keine physiologische Bedeutung nachgewiesen. — *H_2O_2-stabil*. — Wirksam im Keimungstest, unwirksam im Wurzelwachstums- und im Knospentest. — Sonstiges

Verhalten wie die HS-Vorstufe (unter Vorbehalt, da wegen geringer Wirksamkeit Ergebnisse nicht signifikant).

2. Korrelations-HS und HS-Vorstufe lassen sich auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in Benzol trennen.

3. Verhalten der HSe nach operativen Eingriffen:

a) Entblätterung grüner Sprosse: HS-Vorstufe nimmt ab, Korrelations-HS unverändert.

b) *Dekapitation* etiolierter bzw. entblätterter grüner Sprosse: *HS-Vorstufe nimmt zu* (mangelnder Verbrauch), *Korrelations-HS nimmt ab* (mangelnde Bildung).

c) Entwurzelung etiolierter Sprosse: Korrelations-HS nimmt ab (Mangel an Vorstufe).

Frl. Heiderose Rummler und Frl. Christa Herbst möchte ich auch an dieser Stelle für ihre unermüdliche und verständnisvolle Mitarbeit danken.

Literatur.

Baumeister, G.: Planta (Berl.) **38**, 683 (1951). — Boysen Jensen, P.: Planta (Berl.) **31**, 653 (1941). — Dostál, R.: Ber. dtsch. bot. Ges. **27**, 547 (1909); **57**, 204 (1939). — Acta Soc. Sci. Nat. Moravicae **3**, 83 (1926). — Hemberg, T.: Acta Horti Bergiani **14**, 133 (1947). — Physiol. Plantarum (Copenh.) **2**, 24 (1949a); **2**, 37 (1949b); **5**, 115 (1952). — Larsen, P.: Planta (Berl.) **30**, 160 (1939). — Libbert, E.: Flora (Jena) **141**, 271 (1954a). — Planta (Berl.) **44**, 286 (1954b); **45**, 68 (1955a). — Naturwiss. **42**, 158 (1955b). — Mayer, A. M.: Physiol. Plantarum (Copenh.) **6**, 413 (1953). — Meinl, G., u. H. v. Guttenberg: Planta (Berl.) **44**, 121 (1954). — Meyer, E.: Planta (Berl.) **38**, 213 (1950). — Moewus, F.: Biol. Zbl. **68**, 118 (1949). — Pohl, R.: Planta (Berl.) **39**, 105 (1951). — Rippel, K.: Planta (Berl.) **30**, 689 (1939). — Snow, R.: New Phytologist **36**, 283 (1937); **38**, 210 (1939). — Stewart, W. S.: Bot. Gaz. **101**, 91 (1939). — Tegethoff, B.: Planta (Berl.) **38**, 648 (1951). — Vogt, I.: Planta (Berl.) **40**, 145 (1951). — Voss, H.: Planta (Berl.) 30, 252 (1939).

Dr. habil. Eike Libbert, Berlin N 4, Invalidenstraße 42.

Planta, Bd. 45, S. 426—454 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

CYTOLOGISCHE STUDIEN AN LEUKOPLASTEN UNTERIRDISCHER PFLANZENORGANE.

Von

FRITZ BARTELS.

Mit 25 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. Dezember 1954.)

Seit SCHIMPER (1885) sieht man die Chloroplasten, Chromoplasten und Leukoplasten als homologe Gebilde an, die sich nur im Pigmentgehalt und in ihrer Funktion unterscheiden und durch eine „Metamorphose" jede Differenzierungsform annehmen können. Die Frage, ob der für die Chloroplasten erwiesene granuläre Aufbau für alle Plastidenformen zutrifft, ist bisher wenig diskutiert worden.

Wenn im folgenden versucht wird, die Erörterungen aufzuzeigen, die den Arbeiten SCHIMPERS vorausgingen und dann bei SCHIMPER (1885) im wesentlichen ihren klärenden Abschluß fanden, so geschieht dieses im Hinblick auf DE REZENDE-PINTO (1948a; 1952). Dieser Autor griff zur Stützung seiner Auffassung einzelne Arbeiten heraus, ohne die mit dieser Fragestellung sich befassende Gesamtliteratur zu berücksichtigen.

Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde in zahlreichen Arbeiten der Zusammenhang zwischen Stärkekörnern und Plastiden diskutiert: MULDER (1830) war der Ansicht, daß beim Ergrünen Stärkekörner in Chloroplasten verwandelt werden. CRÜGER (1854) fand in farblosen pflanzlichen Geweben überall, wo er ernstlich danach suchte, Leukoplasten. Allerdings hielt CRÜGER diese farblosen Plastiden noch für eine Zwischensubstanz der Stärkesynthese. (Bei den *Euphorbiaceen* versuchte CRÜGER vergeblich, Leukoplasten zu finden; hier entdeckte erst POTTER (1884) die Plastiden im Milchsaft.) MOHL (1837; 1855) schrieb den Stärkekörnern wie den Chloroplasten eine voneinander unabhängige Genese aus dem Cytoplasma zu. Dagegen meinte BÖHM (1856), die Chloroplasten entständen durch Umwandlung aus Stärkekörnern.

Es war dann SACHS (1862), der auf experimentellem Wege klärte, daß die Stärkeeinschlüsse nichts mit der Entstehung der Chloroplasten zu tun hätten, sondern die Stärke vielmehr „ein Produkt des Lebenstätigkeit der Chlorophyllkörner" sei (SACHS 1865, S. 315). Er folgerte hieraus für die Plastiden eine Genese aus dem Cytoplasma, machte allerdings Einschränkungen und schrieb: „Ausnahmsweise und in Organen, die ursprünglich zur Chlorophyllbildung nicht bestimmt sind, wie bei den am Licht liegenden Kartoffelknollen kann es vorkommen, daß sich früher farbloses Protoplasma um Stärkekörner herumlagert, sie einhüllt und dabei selbst ergrünt; derartige Formen sollte man, wenn ihre Entstehung wirklich diese ist, als falsche oder nachahmende Chlorophyllkörner unterscheiden."

HABERLANDT (1877) und MIKOSCH (1878) vertraten erneut die Ansicht, daß die Chloroplasten sich aus Stärkekörnern bildeten. MIKOSCH bestätigte dann nochmals diese Auffassung durch Veröffentlichung seiner Beobachtungen an den

Primordialblättern von *Zea Mays* und am jüngeren Gewebe von *Elodea* (1885). MEYER (1895) vermutete aber, daß MIKOSCH hier Stärkekörner beobachtet habe, die auf Grund der angewandten Präparationsmethode aus den Plastiden herausgetreten waren und frei im Cytoplasma lagen. Erst die Arbeiten von DEHNECKE (1880) und insbesondere von SCHIMPER (1880) brachten eine befriedigende und seitdem allgemein anerkannte Lösung der Frage nach dem Zusammenhang von Stärkekörnern und Plastiden. Die in diesen Arbeiten publizierten Ergebnisse, auf die weiter unten eingegangen wird, fanden dann bei SCHIMPER (1885) und MEYER (1895) eine erweiterte und zusammenfassende Darstellung.

Wie bereits erwähnt, setzte sich MIKOSCH (1885) zu SCHIMPERS Auffassung in Kontroverse. Ferner sah BELZUNG (1887) frei in der Zelle liegende Stärkekörner als Produkt des Cytoplasmas an. Diese Beobachtung wies SCHIMPER (1887) als unrichtig zurück. In der darauffolgenden Erwiderung blieb jedoch BELZUNG (1891) bei seiner Ansicht, die später von DE REZENDE-PINTO (1952) zur Stützung seiner Hypothese herangezogen wurde. — 1895 nahm dann MEYER zu BELZUNGS Entgegnung Stellung und äußerte, dieser habe sich „schwierigste Objekte" ausgesucht und deshalb „bei seiner Untersuchungsmethode negative Resultate" erzielt.

SCHIMPER (1880) erkannte in seiner grundlegenden Arbeit, daß die Stärkekondensation immer, auch in nichtassimilierenden Zellen, an „Stärkebildner" gebunden ist und formulierte mit aller Vorsicht: „..., daß eine so tiefe Kluft, wie man sie bis jetzt zwischen der Stärkebildung der assimilierenden und derjenigen der nichtassimilierenden Zellen annahm, in der Tat nicht besteht. In den chlorophyllfreien Zellen sind es auch bestimmte Organe, welche die Stärke erzeugen, und die Organe sind nichts anderes als unentwickelte Chlorophyllkörner, die unter dem Einfluß des Lichtes sich im allgemeinen zu solchen umzubilden vermögen." In seiner späteren Arbeit (1885) hatte sich SCHIMPERS Auffassung so gefestigt, daß er die „Stärkebildner" nun endgültig als „Leukoplasten" bezeichnete. In dieser Veröffentlichung definierte SCHIMPER unter Berücksichtigung seiner früheren Termini (1883) und des Vorschlags von STRASBURGER (1884) die heute übliche Plastidenterminologie. Seit dieser Zeit unterscheidet man bei den Plastiden Leukoplasten, Chloroplasten und Chromoplasten. SCHIMPER betrachtete sie als homologe Gebilde, „sie stellen bloß verschiedene Formen gleichwertiger Plasmagebilde dar und wandeln sich sogar ineinander um" (1885, S. 2). „Leukoplasten und Chromoplasten sind Metamorphosen der Chloroplasten; erstere sind durch gänzliches Verschwinden der Farbstoffe, letztere durch das Ersetzen des Chlorophylls durch andere Pigmente entstanden" (1885, S. 31).

SCHIMPER machte allerdings Einschränkungen bei der Umwandlung der Leukoplasten zu Chloroplasten in den unterirdischen Organen. Nach seiner Ansicht „sind nämlich keineswegs alle im Dunkeln wachsenden Pflanzenteile fähig, bei Lichtzutritt zu ergrünen ... Bei einigen Pflanzen findet zwar Ergrünung der ganzen Wurzel statt, dieselbe geht dann aber äußerst langsam vor sich" (1885, S. 53). Das Nichtergrünen der Wurzeln stellte für SCHIMPER die Regel dar, das Ergrünen die Ausnahme.

Erst 20 Jahre später berührte LOPRIORE (1904) dieses Problem wieder und wies auf einen vom Leitgewebe abhängigen Ergrünungsgradienten hin. Die Frage nach der Ergrünungsfähigkeit der Wurzeln fand dann 1920 eine präzisere Bearbeitung durch SIEBERT. Von 58 untersuchten Pflanzen der Gymnospermen, Monocotyledonen und Dicotyledonen ergrünten 46; von den 12 nichtergrünten Arten gehörten allein 8 den Glumifloren an. Man kann deshalb wohl im Gegensatz zu SCHIMPER das Ergrünen der Wurzeln unter geeigneten Bedingungen als Regel ansehen, dagegen das Nichtergrünen als Ausnahme. Die Ergebnisse SIEBERTS wurden von GAUTHERET (1932; 1941) und FIEDLER (1936; 1938) bestätigt.

Die strukturellen Verhältnisse bei der Metamorphose der Leukoplasten zu Chloroplasten blieben von SIEBERT, GAUTHERET und FIEDLER unbeobachtet. Erstmalig berichtete wohl MEYER (1895, S. 168) von leicht ergrünten Leukoplasten der Kartoffelknolle, die granulös erschienen. 1943 wiesen dann JUNGERS u. DOUTRELIGNE nach, daß ergrünte Leukoplasten der Kartoffelknolle eine polygranuläre Struktur zeigten wie die Chloroplasten in den oberirdischen Organen.

DE REZENDE-PINTO (1948a, b; 1952) erwähnte mehrfach eine polygranuläre Struktur beim Ergrünen von Stärke führenden Leukoplasten. Bei der Knolle von *Solanum tuberosum* bildete nach Auffassung dieses Autors das das Stärkekorn „umhüllende Cytoplasma" ein „granulöses Reticulum", dessen „Granula" nach einiger Zeit zunehmend ergrünten. DE REZENDE-PINTO kam so unter Hinweis auf BELZUNG (1891) zu der Ansicht, daß die „Amylo-Chloroplasten" einen gemischten Ursprung aus dem Cytoplasma und dem Stärkekorn haben. — Weiterhin beschrieb DE REZENDE-PINTO die Plastiden, die im Rhizom von *Iris germanica* den Stärkekörnern aufsitzen, als Grana führend: Die „Amyloplasten" wandelten sich bei diesem Versuchsobjekt allmählich in „Oleoplasten" um, an deren Oberfläche sich „cytoplasmatische Kalotten" bildeten, die immer mehr Grana zeigten, wobei schließlich die „Granula" eine grüne Färbung annahmen. DE REZENDE-PINTO (1952) zitierte bei diesem Phänomen QUEKETT (1846) und MULDER (1830), nach deren Beobachtung die Chloroplasten in direkter Metamorphose aus Stärkekörnern entstanden. Die nach der Arbeit von MULDER einsetzende Diskussion und die weiteren Arbeiten über das Problem wurden von DE REZENDE-PINTO nicht erwähnt. Ebenso unberücksichtigt von ihm blieben SCHIMPERS (1880; 1885) und MEYERS (1883) Mitteilungen, daß im Rhizom von *Iris germanica*, *I. florentina* und *I. pseudacorus* den Stärkekörnern stets Leukoplasten aufsitzen, die „sehr charakteristisch körnig sind". Nach MEYER reagierten diese „Körnchen" genau so wie die „Kügelchen" (= Grana) der Chloroplasten. — Im Verlaufe der späteren Ausführungen wird auf weitere Einzelheiten der Arbeiten von DE REZENDE-PINTO einzugehen sein.

Aus den bisherigen Veröffentlichungen ist ersichtlich, daß bei ergrünten Leukoplasten im Rhizom von *Iris* und in der Sproßknolle von *Solanum tuberosum* eine polygranuläre Struktur auftritt. Es ist nun Aufgabe der vorliegenden Arbeit zu prüfen, ob auch bei ergrünten Plastiden einer echten Wurzel ein granulärer Aufbau in Erscheinung tritt. Wenn dieses der Fall ist, ergibt sich die Frage, wann die Ausbildung der Grana einsetzt. STRUGGER (1950; 1953; 1954) hat den Nachweis geführt, daß die Ontogenese der fertig strukturierten Chloroplasten vom Proplastid ausgeht, welches nur ein „primäres Granum" besitzt. STRUGGER stellt nach dieser Beobachtung zur Diskussion, ob das Primärgranum Anteil

am Plastogenkomplex haben könnte. Diese Hypothese in Verbindung mit SCHIMPERs Ansicht von der Plastidenmetamorphose würde dann eine Kontinuität der Grana in allen Differenzierungsformen der Plastiden fordern. Mindestens in ihren Proplastiden müßte jedoch ein Primärgranum vorliegen. Nach diesen Ausführungen könnte es denkbar sein, daß der Leukoplast auf dem monogranulären Stadium stehengeblieben ist. Er würde so eine Vorstufe des Chloroplasten darstellen. Man könnte aber auch andererseits eine polygranuläre Entwicklung aller Plastidenformen erwägen, die weitgehend unabhängig von einer Pigmenteinlagerung verliefe. In diesem Falle müßten allerdings die Grana in den ausgewachsenen Leukoplasten faßbar sein, wobei eine eventuelle sekundäre Rückbildung der Grana zu berücksichtigen wäre.

I. Untersuchungen an lebenden Zellen.

1. Studien an Gewebeschnitten aus rhizombürtigen Wurzeln von Iris germanica und I. florentina.

In fast allen Veröffentlichungen über Leukoplasten sind Hinweise auf die Hinfälligkeit dieser Plastiden enthalten. STRASBURGER (1884, S. 64 und 68) berichtete: „Die Leukoplasten sind sehr klein und sehr vergänglich, so daß sie äußerst leicht durch die Präparation leiden." „An Schnitten, die in Wasser gelegt werden, verschwinden die Leukoplasten fast momentan." Ferner schrieb STRASBURGER über Schnitte aus dem Rhizom von *Iris germanica*, daß hier die Leukoplasten alsbald körnig werden, „schließlich in kleine Körner zerfallen, die Molekularbewegung zeigen". — Ebenso wiesen SCHIMPER, MEYER und KÜSTER (1951) wiederholt auf die Empfindlichkeit der Leukoplasten bei der Präparation hin.

Voruntersuchungen an den Wurzeln von verschiedenen Pflanzen ergaben, daß die Erhaltung, die Erkennbarkeit und die Form der Leukoplasten weitgehend von der Konzentration der Einbettungsmedien abhängig sind. Da die Plastiden in den Längsschnitten aus der Wurzel von *Iris germanica* und *I. florentina* bei einer Hellfeldbeobachtung bereits ohne jegliche Vorbehandlung eine polygranuläre Struktur erkennen lassen, sind zunächst an diesen Objekten genauere Untersuchungen durchgeführt worden. Der grenzplasmolytische Wert (FITTING 1917, nach STRUGGER 1949) des jeweiligen Versuchsobjektes gab für die Konzentrationsbereiche des Einbettungsmediums einen Maßstab.

Zur Ermittlung des grenzplasmolytischen Wertes wurden aus gleichwertigem Gewebe jeweils zahlreiche, wenige Quadratmillimeter große Handschnitte (längs) hergestellt, und zwar so dünn, daß Wundreizschädigungen gerade noch vermieden waren. Das normale Aussehen des Kernes, der Sphärosomen, der Chondriosomen und der Plasmaströmung diente als Kriterium für lebende Zellen. Die Verteilung der Schnitte erfolgte sofort in unterschiedlich konzentrierte Rohrzuckerlösungen. Die Konzentrationen differierten jeweils von Schälchen zu Schälchen um $^2/_{100}$ Mol. —

Als Zucker fand Mercks „Saccharose puriss. pro injectione" Verwendung, da die Lösungen dieses Zuckers länger als die „alkoholgefällte Saccharose für bakteriologische Zwecke" steril gehalten werden konnten. Die mikroskopischen Beobachtungen wurden auf Objektträgern mit eingeschliffener Vertiefung durchgeführt. Als Mikroskop stand das Leitzsche binokulare Forschungsmikroskop BST 29/92 mit den Objektiven „Öl 100/1,30" und „Fl.Öl 114/1,32" und einer Niedervoltlampe zur Verfügung.

Bei *Isotonie* der Zuckerlösung zur Zellsaftkonzentration zeigten die Leukoplasten der *Iris*arten eine spindelförmige Gestalt (Abb. 3). Die Plasmaströmung führte die Plastiden mit sich, die dann den kurvenreichen Strömungslinien des Cytoplasmas, insbesondere in den Zellecken,

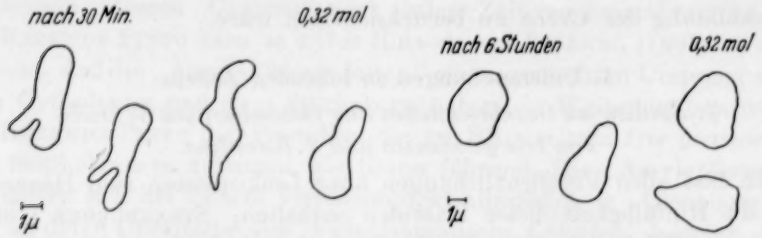


Abb. 1. Abb. 2.

Abb. 1 u. 2. Plastiden aus Längsschnitten vom Rindenparenchym der *Iris*wurzel. Grenzplasmolytischer Wert 0,3 Mol , beobachtet in 0,32 mol. Zuckerlösung. 1. Ein und dasselbe Plastid in seinen innerhalb von 20 min veränderten Umrißformen; beobachtet nach 30 min langem Aufenthalt in der schwach hypertonischen Lösung. 2. Plastidenformen nach 6stündigem Aufenthalt in der hypertonischen Lösung.

durch Biegung und Drehung des Körpers angepaßt wurden. Es konnte häufig eine Verwindung des Plastidenkörpers um seine Längsachse beobachtet werden. Die stärkefreien Plastiden zeigten eine lebhafte Amöboidie. Die Grana waren, abgesehen von den randnahen Zonen, als Kreisflächen sichtbar und in Längsreihen angeordnet. Sie durchzogen bei Verdrehung des Plastidenkörpers in einer Schraubenlinie den Leukoplasten. Das Verhältnis der Längsreihen zueinander war durch eine vitale Beobachtung nicht eindeutig analysierbar. Die Grana ließen sich wie bei den Chloroplasten (STRUGGER 1937a u. b) mit Rhodamin B elektiv färben.

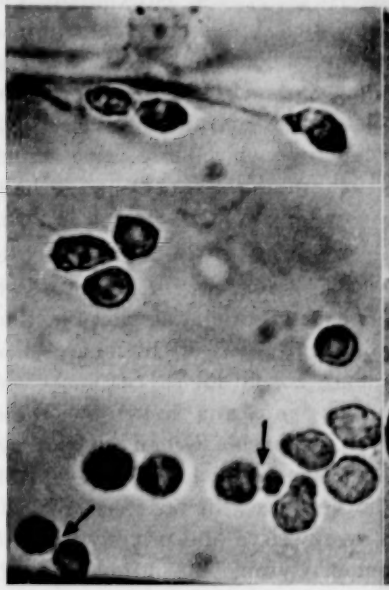
Im schwach *hypertonischen* Medium zeigten die Leukoplasten anfänglich lebhafte Formveränderungen, später rundeten sie sich unter Volumenverlust mehr und mehr ab. Die Lebhaftigkeit der Pseudopodienbildung nahm bei längerem Verweilen im hypertonischen Milieu ab. Nach etwa 6 Std. traten Formveränderungen dieser Art nur noch vereinzelt auf (Abb. 1 und 2). — Die geschilderten Vorgänge entsprachen den Beobachtungen, die GICKLHORN (1932) an den Leukoplasten in der unteren Blattepidermis von *Orchis latifolia* und *O. maculata* beschrieb. Es wäre erstrebenswert, die Versuche GICKLHORNs mit einer noch geringeren

Diffusionsgeschwindigkeit zu wiederholen und vor allem auch auf isotonische und hypotonische Bereiche auszudehnen. — Lagen die Schnitte der *Iris*wurzel noch länger in der hypertonischen Zuckerlösung, so traten die Grana in den Randzonen deutlicher in Erscheinung und verursachten hier meist Ausbuchtungen in den Umrißlinien. Jedoch erschwerten die plasmolytischen Veränderungen des Cytoplasmas die Beobachtungen.

Abb. 3.

Abb. 4.

Abb. 5.



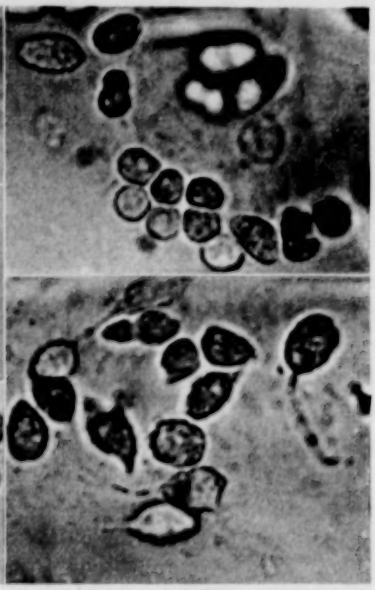


Abb. 6.

Abb. 7.

Abb. 3—7. Aus dem mikrophotographischen Protokoll eines Quellungsversuches an den Plastiden *eines* vitalen Gewebeschnittes aus dem Rindenparenchym der Wurzelhaarzone von *Iris germanica*. Nach jeder Aufnahme ist der Schnitt zur Vermeidung von pathologischen Veränderungen bis zur nächsten Beobachtung in die Zuckerlösung des Deckelschälchens zurückgelegt worden. — Der grenzplasmolytische Wert wurde mit 0,28 Mol ermittelt. Die Überführung des Längsschnittes in eine 0,24 mol. Zuckerlösung erfolgte um 17^{15} Uhr. (Leica mit Aufsetzkamera von Zeiss-Winkel; Vergrößerung etwa 2200mal.) Abb. 3. 17^{40} Uhr (nach 25 min). Die Leukoplasten zeigen spindelförmige Gestalt. Die Grana sind zum Teil, vorwiegend in Randnähe, sichtbar. Abb. 4. 19^{45} Uhr (nach 2 Std. 30 min). Mit der langsamen Wasseraufnahme ist ein allmähliches Abrunden der Plastiden verbunden. In diesem Stadium treten vorübergehend Vacuolen im Stroma auf. Abb. 5. 20^{10} Uhr (nach 2 Std. 55 min). Bei Teilungsstadien quillt die Mittelzone (↑) nicht auf. Deutlich sind die nicht unterbrochenen Umrißlinien der Plastiden zu erkennen. Abb. 6. 20^{15} Uhr (nach 3 Std.). Legen sich die Plastiden in diesem Quellungszustand aneinander (Systrophe), so platten sich ihre Berührungsflächen ab. Abb. 7. 22^{25} Uhr (nach 5Std. 10 min). Die Plastidengrenzschicht ist gesprengt, rosenkranzartige Fortsätze hängen den Plastiden an. Die Umrißlinien sind unregelmäßig und mehrmals unterbrochen.

Wesentlich einfacher und vor allem aufschlußreicher waren die Untersuchungen im *hypotonischen* Medium. Das Quellen des Plastidenstromas war mit einer Abrundung der Plastiden verbunden. Meist traten vorübergehend im Stroma einige kleine Vacuolen auf. Nach

weiterem Quellen gerieten die Grana in BROWNsche Molekularbewegung. Bei diesen Plastiden wurden mit Hilfe eines Okulargitternetzes eingehende Beobachtungen der Bewegung jeweils eines Granums durchgeführt. Es ließ sich erkennen, daß die Grana nicht wie freie Korpuskeln bewegt wurden, sondern eine pendelähnliche Bewegung zeigten.

Der bisher geschilderte Quellungsvorgang, also einschließlich der BROWNschen Bewegung der Grana, ließ sich durch Überführung in ein nicht zu stark hypertonisches Medium reversibel gestalten. Dies geschah mit einer Konzentration, die $^2/_{100}$ bis $^4/_{100}$ Mol oberhalb des grenzplasmolytischen Wertes lag. Wenn die Plastiden wiederum Spindelform angenommen hatten, konnten die Schnitte nach Überführung in eine isotonische Lösung mehrere Tage unverändert am Leben erhalten werden.

Beließ man aber die Schnitte, in denen die Grana innerhalb der Plastiden in Bewegung geraten waren, weiterhin in hypotonischer Lösung, so kam es nach geraumer Zeit zur Sprengung der Plastidengrenzschicht. Die Grana wurden dabei einzeln oder zu mehreren zusammengeballt herausgeschleudert und zogen meist Stromaplasmastränge nach sich. Die Scheibchennatur der Grana konnte bei diesem Vorgang wiederholt beobachtet werden. Einzelne Grana überschlugen sich beim Herausschleudern mehrmals, so daß sich ein und dasselbe Granum von allen Seiten zeigte. Die herausgeschleuderten Plastidenteile wurden als kugelige oder fädige, verzweigte und unverzweigte, oft rosenkranzartige Gebilde im strömenden Cytoplasma mitgeführt. Die Restkörper der Plastiden zeichneten sich durch unregelmäßige, bizarre Umrißlinien aus. Die Plasmaströmung in derartigen Zellen war lebhaft, der Kern zeigte undeutliche Konturen. Es war überraschend, daß sich in derartigen Präparaten Zellen mit Plastidentrümmern bis zu 3 Wochen, meist bis zu ihrer völligen Verpilzung, in diesem Zustand am Leben erhalten ließen. Die Voraussetzung dazu war allerdings ein Experimentieren mit geringen Konzentrationsunterschieden, damit der Quellungsvorgang äußerst langsam vor sich ging. — Die beschriebenen Beobachtungen im hypotonischen Medium sind durch die Mikrophotographien (Abb. 3—7) belegt.

2. Quellungsversuche an den Leukoplasten der Vicia-Faba-Wurzel.

Mit der bei den Versuchen an *Iris* beschriebenen Methode erfolgte nun eine Untersuchung der Plastiden in Längsschnitten aus dem Rindenparenchym aller Alterszonen der Hauptwurzel von etwa 2—3 Wochen alten *Vicia-Faba*-Keimlingen. Im *isotonischen Medium* hatten die Leukoplasten eine länglich-ovale Form. Ihr Lichtbrechungsindex und der des umgebenden Cytoplasmas unterschieden sich nur wenig, dadurch war eine optische Analyse erschwert. Das Auffinden der Leukoplasten

wurde jedoch durch Beachten des Sphärosomen erleichtert; denn diese bewegen sich innerhalb einer Zelle in einer im Verhältnis zu den Plastiden und Chondriosomen der Peripherie näher gelegenen Schicht des Cytoplasmas. Verlegt man von den leichter erkennbaren Sphärosomen aus die optische Ebene um ein geringes zelleinwärts, so trifft man mit Sicherheit auf die sich dort befindenden Leukoplasten und Chondriosomen. Grana waren in den Plastiden im isotonischen Medium nicht zu erkennen. Nachdem im weiteren die Längsschnitte in eine hypotonische oder auch hypertonische Lösung überführt waren, hoben sich die Plastiden bald stärker vom umgebenden Cytoplasma ab; alsdann trat nach einiger Zeit eine Abkugelung des Plastidenkörpers ein, und peripher gelagerte Grana waren zu sehen.

Die Grana konnten durch extreme Konzentrationsänderungen des Einbettungsmediums in kürzester Zeit sichtbar gemacht werden, jedoch zeigten die Zellen dann pathologische Veränderungen. Dieser Befund

Abb. 8.

Abb. 9.

Abb. 10.

Abb. 8. Die um den Kern gelagerten Plastiden heben sich nur schwach von ihrer Umgebung ab, ihre länglich-ovale Form ist aber noch erkennbar. (Keimling 14 Tage alt, Längsschnitt aus dem Rindenparenchym der Seitenwurzelzone; grenzplasmol. Wert 0,28 Mol; Einbettungskonz. 0,28 Mol; Leica mit Aufsetzkamera von Zeiss-Winkel; Vergrößerung etwa 2000 mal.)

Abb. 9. Man erkennt 3 Grana in den gequollenen und abgerundeten Plastiden, ebenso die charakteristischen Beugungsbilder der Sphärosomen. Der Schnitt hatte $5^1/_4$ Std. in einer 0,18 mol. Zuckerlösung gelegen. (Keimling 14 Tage alt; Längsschnitt aus der Wurzelrinde der Differenzierungszone; grenzplasmol. Wert 0,22 Mol; Leica mit Mikas von E. Leitz $^1/_3$mal; Vergrößerung etwa 1200 mal.)

Abb. 10. Bei der vitalen Beobachtung konnten in den dargestellten, gequollenen Leukoplasten 8—10 Grana gezählt werden. Die Aufnahme läßt nur einen Teil von diesen erkennen. Der Schnitt lag $4^1/_2$ Std. in einer 0,18 mol. Zuckerlösung. (Keimling 17 Tage alt; Längsschnitt aus dem Rindenparenchym unmittelbar nach der Wurzelhaarzone; grenzplasmol. Wert 0,26 Mol; Leica mit Mikas von E. Leitz; Vergrößerung etwa 1700 mal.)

gab die Gewißheit, daß es sich bei den Grana, die durch Quellen des Stromas sichtbar werden, nicht um Stärkekörner handelte. Der negativ verlaufene Stärkenachweis mit Jodjodkalium und die gegenüber einem Stärkekorn unterschiedliche Lichtbrechung festigten diese Ansicht. Außerdem waren die Grana von einer auffallenden Gleichmäßigkeit, wie sie bei Stärkekörnern mit entsprechenden Dimensionen nicht zu beobachten war. Bei gleichalten Plastiden wurde ferner eine annähernd übereinstimmende Anzahl der Grana vorgefunden. Diese Beobachtungen haben mit dazu beigetragen, in den beschriebenen Grana den Plastiden zugehörige Strukturelemente zu sehen.

Um möglichst schonend in das Zellgeschehen einzugreifen, wurde mit einer Zuckerlösung experimentiert, deren Konzentration $^2/_{100}$ bis $^4/_{100}$ Mol unter dem grenzplasmolytischen Werte lag. Das Quellen des Stromas erstreckte sich dann über einen Zeitraum von 6—12 Std. Wenn nach Sichtbarwerden der Grana das Medium zur nunmehrigen Zellsaftkonzentration isotonisch gehalten wurde, so ließen sich die Schnitte in diesem Zustand bis zu 2 Wochen und länger am Leben erhalten.

Durch Umkehrung des Quellungsvorganges wurden die Leukoplasten erneut optisch homogen. Die Plastiden konnten dann noch mit der von Böhm (1883; Bokorny 1888; Winkler 1898 u. a.) angewandten Methode zur Bildung von Stärkekörnern gebracht werden.

Bei Erhaltung der Hypotonie quoll das Plastidenstroma weiter, bis es schließlich zu einer Plastidenplasmoptyse kam; jedoch spielte sich dieser Vorgang nicht so auffallend ab, wie er bei *Iris* beschrieben wurde. Auch gelang es nicht, die Grana vorher in Brownsche Bewegung zu bringen; die Viscositätsverhältnisse der Leukoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzel lassen das offenbar nicht zu. — Die beschriebenen Beobachtungen sind durch die Mikrophotographien (Abb. 8—10) belegt.

3. Nachweis von Lipoiden in den Grana der Leukoplasten der Vicia-Faba-Wurzel.

Es lag nahe, die bei Quellung der Leukoplasten in Erscheinung tretenden Grana denjenigen der Chloroplasten gleichzusetzen und in den Grana der Leukoplasten ebenfalls lipoidhaltige Strukturen zu vermuten. Diese Annahme fand noch eine weitere Verstärkung, als mit „AP-Sudan" (nach Czapek 1919) rote Tröpfchen an den Leukoplastentrümmern nachgewiesen werden konnten. Es wurde deshalb im weiteren versucht, die Grana im vitalen Zustand mit Mercks Rhodamin B (Strugger 1937a und b) herauszufärben. Um bei der Färbung ungequollene und gequollene Stadien der Plastiden zu erfassen, fand wiederum eine Reihe von Deckelschälchen mit unterschiedlich konzentrierter Zuckerlösung Verwendung. Als Lösungsmittel diente eine wäßrige Rhodamin B-

Lösung (1:20000). Die Schnitte kamen für 2—8 Std. in die Farblösungen und wurden anschließend in einer farblosen Zuckerlösung von jeweils der gleichen Konzentration bis zu 12 Std. differenziert.

Es ergab sich, daß nicht nur in den Leukoplasten mit gequollenem Stroma die Grana elektiv gefärbt waren, sondern auch in den ungequollenen, länglich-ovalen Plastiden rotgefärbte Grana auftraten. Also zeigten die Leukoplasten auch im isotonischen Medium, in dem bei farbstofffreier Zuckerlösung die Plastiden homogen erschienen, eine polygranuläre Struktur (Abb. 11 und 12).

Abb. 11.

Abb. 12.

Abb. 11 und 12. Bei den Leukoplasten sind im isotonischen Milieu die Grana mit Rhodamin B herausgefärbt. Sie sind etwa 0,3 μ groß und in ungequollenem Stroma weniger scharf konturiert. Deshalb soll die in Abb. 12 nach einer mikroskopischen Analyse hergestellte Zeichnung zur Erläuterung dienen. (Keimling 12 Tage alt; Längsschnitt aus dem Rindenparenchym der Seitenwurzelzone; grenzplasmol. Wert 0,28 Mol; bei 0,28 Mol 5 Std. lang gefärbt und 6 Std. differenziert; Leica mit Mikas von E. Leitz; Vergrößerung etwa 1200 mal.)

4. Ergrünungsversuche an Wurzeln von Vicia-Faba-Keimlingen.

Die Lipophilie der Plastidenpigmente ließ vermuten, daß beim Ergrünen der *Vicia-Faba*-Wurzeln auch die Chlorophylle und Carotinoide wie Rhodamin B in den Grana der Leukoplasten angelagert werden und somit die Grana optisch faßbar sein müßten. Das Experiment bestätigte diese Annahme.

Die Ergrünungsversuche, die bei Tageslicht im Freiland oder im Gewächshaus durchgeführt wurden, scheiterten an einer stark einsetzenden Veralgung der Keimlinge und der Kulturgefäße. Die im Belichtungsraum des hiesigen Institutes angestellten Versuche verliefen wesentlich günstiger. Die Keimlinge wurden je nach der Jahreszeit 7—14 Tage lang in Buchensägemehl vorgezogen und zunächst in abgedunkelte Kulturgefäße (Jenaer Glas, Durchmesser etwa 5 cm) überführt. Dann wurden nach 1—2 Tagen die Verdunkelung entfernt und die Wurzeln belichtet. Als Nährlösung fand die Dreisalzlösung von Shive (1915; nach Baumeister 1952) unter Zugabe der Spurenelemente Bor und Mangan Verwendung. Eisen wurde als Eisen-Kalium-Salz der Äthylen-Diamin-Tetraessigsäure hinzugefügt (Jacobson 1951).

Als Beleuchtungsquellen dienten 2 Lampen mit je 2 Leuchtstoffröhren (Osram HNW 202 n 21 40 W und p 11 40 W). In der Höhe der Wurzeln konnte eine Beleuchtungsintensität von etwa 7000 Lux gemessen werden.

Da bereits Lopriore (1904, S. 386) und Siebert (1920) bei der Wurzel von *Vicia Faba* auf Ergrünungsgradienten von der Wurzel-

basis zum Scheitel und vom Zentralzylinder zur Rinde hingewiesen haben, wurde die Wurzel in die aus der Abb. 13 ersichtlichen vier Zonen eingeteilt.

Schon nach einer 6stündigen Belichtungszeit unterschieden sich in den Zonen I und II die Plastiden durch ihr Lichtbrechungsvermögen stärker vom umgebenden Cytoplasma. Nach 18stündiger Belichtung wurden im Zentralzylinder der Zone I in den plastidenführenden Zellen innerhalb des Pericykels diffus ergrünte Plastiden festgestellt, und nach 24 Std. zeigten diese eine undeutliche polygranuläre Struktur. Nach 30stündiger Lichtexposition waren die Grana scharf konturiert. Jetzt trat der Zentralzylinder im Wurzellängs- oder -querschnitt bereits makroskopisch grün in Erscheinung (Abb. 14).

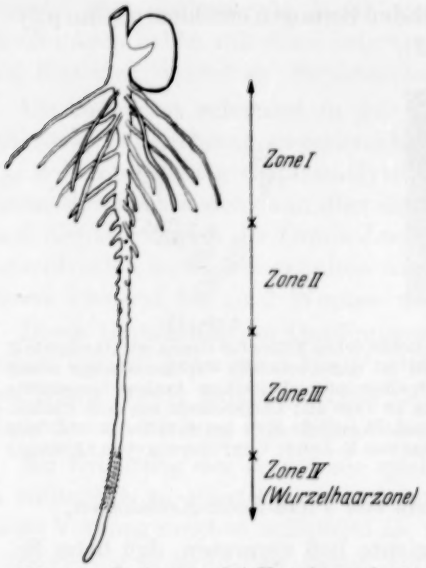


Abb. 13. Zonierung der Hauptwurzel von *Vicia Faba:* Zone I: Seitenwurzeln sind ausgebildet; Zone II: Seitenwurzelanlagen sind makroskopisch erkennbar; Zone III: Wurzelabschnitt zwischen II und IV; Zone IV: Wurzelhaarzone.

Die Grana waren bei diesen Ergrünungsversuchen nach ihrem Sichtbarwerden zunächst als dunkle, kreisrunde Gebilde zu erkennen. Wenn man die Plastiden in diesem Zustand in eine hypotonische Zuckerlösung brachte, so gerieten die Grana, nachdem das Stroma hinreichend gequollen war, innerhalb der unzerstörten Plastidengrenzschicht in BROWNsche Bewegung. Die Beschreibung eines entsprechenden Vorganges erfolgte bereits an den gequollenen Plastiden der *Iris*wurzel. Bei nicht ergrünten Leukoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzel konnte dieses Stadium durch Quellung nicht erreicht werden. Kam es bei den leicht ergrünten Leukoplasten zu einer Plastidenplasmoptyse, so ließ sich auch hier die Scheibchennatur der Grana erkennen.

Mit zunehmender Ergrünung trat auch eine Veränderung der Plastidengestalt von einer länglich-ovalen zu einer mehr kugeligen ein. Nach einer 8—14tägigen Belichtungsdauer hatten die Plastiden des Zentralzylinders der Zone I die für ausgewachsene Chloroplasten typische Linsenform angenommen. Bereits jetzt konnte in der Profilstellung auch deutlich die Scheibchenform der Grana mikroskopisch analysiert, ferner bei genügend großen Plastiden nach einer OsO_4-Fixation und KOH-

Quellung (STRUGGER 1951) ihre geldrollenartige Anordnung bestätigt werden. Es ist anzunehmen, daß die Entstehung der „Geldrollen" auf wiederholte Teilungen dieser parallelen Scheibchen zurückzuführen ist. Für eine experimentelle Bestätigung dieser Hypothese gibt die vorliegende Versuchsanordnung gute Ansatzmöglichkeiten.

Abb. 14. Polygranulär ergrünte Leukoplasten aus Zone I der Wurzelrinde. Nach einer 6tägigen Belichtungsdauer war eine länglich-ovale Form noch vorherrschend. (Keimling 14 Tage alt, davon 6 Tage belichtet; Leica mit Aufsetzkamera von Zeiss-Winkel; Vergrößerung 2200mal.)

Wie bereits LOPRIORE und SIEBERT beschrieben haben, trat der Ergrünungsprozeß im Zentralzylinder mit einer von Zone I zur Zone IV zunehmenden Verzögerung ein. Eine weitere zeitliche Verschiebung der Ergrünung ergab sich dann nochmals in den einzelnen Zonen vom Zentralzylinder zur Rinde. Der Ergrünungsvorgang im einzelnen spielte sich so ab, wie er für den Zentralzylinder der Zone I beschrieben wurde, jedoch mit dem Unterschied, daß die Anzahl der Grana bei den jüngeren Plastiden geringer war und somit auch die Linsenform nicht charakteristisch zur Ausbildung kam. Eine Profilstellung der Grana ließ sich nach hinreichender Belichtung (2—3 Wochen) auch in den Plastiden der Zone III beobachten. Meist zeigten diese ergrünten Leukoplasten, die in der Aufsicht noch nicht kreisförmig waren, dann aber nur 2 Granalagen (Abb. 15).

Abb. 15. Plastid aus dem Rindenparenchym der Zone III zeigt in Profilstellung nur 2 Granalagen. (Der mikrophotographische Beleg ist nicht reproduktionsfähig, liegt jedoch vor. Keimling 28 Tage alt, davon 19 Tage belichtet.)

Eine fluorescenzoptische Überprüfung ergab, daß es nach einer anfänglich schwachen diffusen Fluorescenz des ganzen Plastidenkörpers bei länger belichteten Wurzeln zu einer immer stärkeren Fluorescenz der Grana kam. Die Fluorescenz des Stromas trat mehr und mehr zurück. Die Größe der fluorescierenden Grana war gleichmäßig. Ihre Anzahl entsprach dem Entwicklungsstadium des jeweiligen Plastids.

Zur Kontrolle sind gleichzeitig Parallelversuche mit gleichalten Pflanzen durchgeführt, deren Kulturgefäße abgedunkelt waren. In

Wurzellängsschnitten dieser Versuchspflanzen behielten die Leukoplasten in allen vier Zonen ihre Amöboidie bei und unterschieden sich innerhalb der Zonen nur durch ihre Größe. Es konnte nicht der geringste Ansatz einer Formveränderung beobachtet werden, die der Ausprägung der Linsenform bei ergrünten Leukoplasten entspricht. Die Ausbildung der Linsenform ist also von einer Lichtinduktion abhängig, mit der gleichzeitig eine Chlorophyllsynthese eingeleitet und beeinflußt wird. Diese Beobachtungen stehen mit denen von FASSE (1954) in Übereinstimmung.

5. Nachweis des primären Granums in vitalen Proplastiden des Wurzelspitzenmeristems von Vicia Faba.

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, daß die vitalen Leukoplasten im somatischen Gewebe der *Vicia-Faba*-Wurzel im isotonischen Medium optisch homogen erscheinen. Eine Granastruktur wird sichtbar, wenn a) das Stroma zum Quellen gebracht wird oder b) die Grana mit Rhodamin B angefärbt oder c) durch Lichtexposition Plastidenpigmente synthetisiert und den Grana eingelagert werden. Handelt es sich nun bei den nach diesen 3 Methoden erfaßten Grana um übereinstimmende Strukturelemente der Leukoplasten?

Die elektive Anfärbbarkeit mit Rhodamin B war allen Grana gemeinsam. Plastiden, bei denen im ungequollenen Stroma die Grana mit Rhodamin B angefärbt waren, wurden nachträglich zum Quellen gebracht. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, daß es sich bei den nach a) und b) sichtbar gemachten Grana um dieselben Gebilde handelte.

Unter den ergrünten Grana ließ sich allenfalls eine morphologische Übereinstimmung zwischen den im isotonischen Medium mit Rhodamin B gefärbten Grana und denen in den ergrünten Plastiden, die gerade undeutlich granuliert erschienen, feststellen.

Bei den nach den erwähnten 3 Methoden sichtbar werdenden Grana handelt es sich um die gleichen Gebilde. Diese Gewißheit ergibt sich aus der Tatsache, daß die Granazahl in den Plastiden bei jeder der 3 Methoden übereinstimmend von einem Altersgradienten abhängig ist. Im Rindenparenchym der Zone I konnten je Plastid etwa 30 Grana gezählt werden. Die Anzahl verkleinerte sich zur Wurzelspitze hin immer mehr, so daß in der Differenzierungszone die Jungplastiden[1] 4, 3 oder 2 Grana enthielten.

Die Tendenz, die in der Abnahme der Granazahl liegt, postuliert geradezu auch für die Leukoplasten monogranuläre Proplastiden, deren

[1] In Anlehnung an die von STRUGGER (1954) gegebene Definition der Begriffe „Proplastid" und „Jungchloroplast". Danach sprechen wir von Jungchloroplasten, wenn die Plastiden mehrere Grana zeigen und die Linsenform noch nicht fest ausgeprägt ist. — Proplastiden sind monogranulär und amöboid.

Existenz Strugger (1950; 1953; 1954) für die Proplastiden in den Meristemen der oberirdischen pflanzlichen Organe nachgewiesen hat.

Strugger (1937b; 1953; 1954) berichtete, daß es nicht möglich sei, Grana im meristematischen Gewebe mit Rhodamin B elektiv zu färben. Bei den beschriebenen Ergrünungsversuchen stellte die Wurzelspitze, nachdem der Keimling in die Nährlösung überführt war, vorübergehend ihr Wachstum ein. Die Calyptra löste sich mehr oder weniger ab. Es lagen also Verhältnisse vor, die eine Präparation des Wurzelspitzenmeristems erschwerten. Infolgedessen hatte von den Untersuchungsmethoden nur die Quellungsmethode Aussicht auf Erfolg, die Frage nach der Existenz monogranulärer Proplastiden im vitalen Gewebe experimentell zu klären. Es wurden daher Längsschnitte durch die Wurzelspitze in eine 0,28 mol. Zuckerlösung eingebettet und deren Konzentration bei ständiger mikroskopischer Beobachtung allmählich durch Zufügen von Aqua destillata verringert. Nach etwa 2 Std. waren dann Proplastiden mit gequollenem Stroma und in diesem die Grana zu erkennen. Die Plastiden in der Differenzierungs- und auch schon in der Streckungszone wiesen meist 2—4 Grana auf. Das monogranuläre Stadium mußte deshalb in der postmeristematischen Zone oder im Meristem zu suchen sein. Im Postmeristem konnten dann auch monogranuläre Stadien beobachtet werden, deren Zeichnung in Abb. 16 wiedergegeben ist.

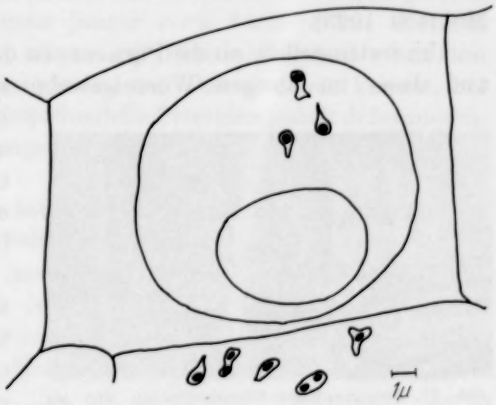


Abb. 16. Postmeristematische Zelle aus der Wurzelspitze von *Vicia Faba*. Das Zellumen ist fast vom Zellkern ausgefüllt, dem Proplastiden mit gequollenem Stroma aufliegen. Die Volumenzunahme wurde bei den Proplastiden deutlich beobachtet. Das Primärgranum war als etwa 0,3 μ großes, dunkleres Gebilde erkennbar. Seine Lagerung in den Proplastiden war recht unterschiedlich.

Diese Beobachtungen des primären Granums machen seine Existenz bereits in den Proplastiden des Wurzelspitzenmeristems wahrscheinlich. Nachdem in fixierten und mikrotomierten Wurzelspitzen monogranuläre Proplastiden nachgewiesen werden konnten (s. Kapitel III, Abschnitt 3), fand obige Beobachtung ihre exakte Bestätigung.

6. Nachweis von Pigmenten in den Plastiden der Wurzel von Iris germanica.

Im Gegensatz zu den Leukoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzel ist bei den Plastiden in den unterirdischen Organen der *Iris*arten bereits in

unbehandelten Längsschnitten eine polygranuläre Struktur sichtbar. Da die plastidenreiche Calyptra gelbgefärbt ist, lag die Vermutung nahe, daß es sich hier um Plastidenpigmente handelt, die auch bei den einzeln liegenden Plastiden in den übrigen Geweben die Grana hervortreten lassen.

Zur Analyse des Farbstoffes wurden Längsschnitte aus der Wurzelspitze im Exsiccator getrocknet. An diesen Schnitten gelang es nach Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure, die für Xanthophyll und Carotin typische rotviolette bis tiefblaue Färbung zu erzielen (nach MOLISCH 1923).

Um festzustellen, ob die Pigmente in den Plastiden lokalisiert waren und diese im übrigen Wurzelgewebe auch Carotinoide enthielten, kam die Phenol-Glycerinmethode nach VAN WISSELINGH (1914) und die Resorcinmethode nach TSWETT (1900) zur Anwendung.

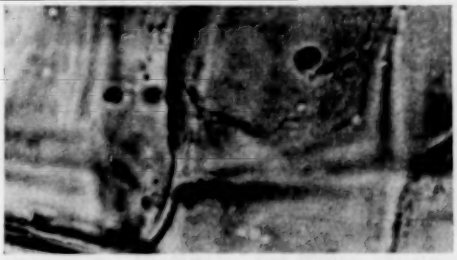


Abb. 17. Polygranuläre Chromoplasten aus der Wurzel von *Daucus carota*. Die Grana heben sich sehr deutlich vom Plastidenstroma ab, da die Carotinoide in den Grana lokalisiert sind. Längsschnitt aus dem Rindenparenchym einer 2 bis 3 mm dicken Wurzel. Der wiedergegebene Zellkomplex war ungfähr 2 cm von der Wurzelspitze entfernt. Einbettung erfolgte in einer 0,36 mol. Zuckerlösung; Vitalaufnahme, Leica mit Aufsetzkamera von Zeiss-Winkel, Grünfilter; Vergrößerung etwa 2000mal.

Die Phenol-Glycerinmethode beruht auf der leichten Löslichkeit der Carotinoide in Phenol. Glycerin ist als Lösungsmittel genommen, da das Reagens sich so schneller mit dem Wasser des Objektes vermischt. Die Reaktion wurde an Längsschnitten unter ständiger mikroskopischer Beobachtung durchgeführt, und alsbald ließen sich in den Zellen gelbe Schlieren beobachten, die von den Plastiden ausgingen.

Eine konzentrierte Resorcinlösung vermag einige Proteine und Lipoide zu lösen. Die freigelegten Pigmente werden dann niedergeschlagen, besonders wenn das Gewebestückchen in Glycerin oder Wasser leicht nachgespült wird. In Längsschnitten, die in einer Resorcinlösung gelegen hatten, konnten nach 6 Std. orangerote, tropfenförmige Aggregate an der Oberfläche der Plastidentrümmer festgestellt werden.

Es bestätigten also beide Nachweismethoden, daß die Plastiden der untersuchten *Iris*arten nach der STRASBURGER-SCHIMPERschen Terminologie „Chromoplasten" darstellen. Zum qualitativen Nachweis wurde der Farbstoff aus der *Iris*wurzel mit Petroleumbenzin extrahiert und der Farbstoffextrakt mit Hilfe der chromatographischen Adsorptionsanalyse (nach TSWETT) in seine Komponenten zerlegt. In der Kartoffelstärke

waren mehrere Isomeren des Xanthophylls und im Aluminiumoxyd eine weitaus geringere Menge an Carotin adsorbiert. Die Absorptionsspektren der so getrennten und in Äther gelösten Farbstoffe bewiesen dann wiederum, daß es sich um Xanthophyll und Carotin handelte.

Als Testobjekt für die oben angeführten Nachweisreaktionen fand die Wurzel von *Daucus carota* Verwendung. Es wurde dabei die in die Gesamtproblematik der vorliegenden Arbeit sich einfügende Beobachtung gemacht, daß die Chromoplasten der Mohrrübe eine polygranuläre Struktur aufwiesen (Abb. 17). Es traf dies zu, wenn Chromoplasten aus dem Rindenparenchym ganz junger etwa 2 mm dicker Wurzeln beobachtet wurden. Darüber, wie es zur Herausbildung der aus den Lehrbüchern bekannten Chromoplasten von *Daucus carota* kommt, bei denen die Carotinkristalle die ursprüngliche Plastidengestalt deformieren, sollen eingehende Untersuchungen folgen.

II. Diskussion der Befunde bei den Untersuchungen der Plastiden in vitalen Schnitten.

Die bei den Leukoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzel beschriebenen Ergebnisse wurden auch an den vitalen Plastiden der Wurzel folgender Pflanzen erzielt: *Ranunculus Ficaria, Begonia Scharffiana, B. ulmifolia, B. undulata, Oxalis Acetosella, Ricinus communis, Pisum sativum, Allium cepa, Helianthus annuus.*

In den Plastiden der Wurzeln der aufgeführten Pflanzenarten waren im durchfallenden Licht mikroskopisch zwei Phasen zu erfassen: 1. das durch Wasser bis zur Löslichkeit quellbare Stroma und 2. das stark lipoidhaltige in Wasser unlösliche Granasystem. Wenn das Stroma und die Grana in ihren Lichtbrechungsindices keinen sprunghaften Unterschied aufwiesen und die Grana keine Pigmente enthielten, erschienen die Plastiden homogen. Es handelte sich dann um „optisch maskierte Grana". Dieses war bei den Plastiden der Fall, die den Leukoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzel entsprachen.

Die „maskierten Grana" werden sichtbar, sobald ihnen eine genügende Menge lipophiler Farbstoffe eingelagert ist, wie es im Experiment mit Rhodamin B oder durch die Ergrünungsversuche geschah. Die Plastiden bei den *Iris*arten und *Daucus carota* trugen im natürlichen Zustand Xanthophyll und Carotin, deshalb waren die Grana bereits in unbehandelten Schnitten zu erkennen.

Die „maskierten Grana" in den Leukoplasten bei *Vicia Faba* konnten außerdem durch Quellung des Plastidenstromas optisch hervortreten.

Die im Abschnitt 4 beschriebene Grünfärbung und Fluorescenz im Stroma und in den Grana während der Anfangsphase der Ergrünung sind im Hinblick auf die gegenteiligen Auffassungen von Heitz u. Maly

(1953) und STRUGGER (1950; 1953; 1954) noch schwer zu deuten. Es bestehen prinzipiell 3 Möglichkeiten:

1. Nach der Konzeption von HEITZ u. MALY könnten die Plastiden zunächst granafrei sein, und das Chlorophyll tritt diffus im Stroma auf. Erst sekundär bilden sich die Grana, in welche das Chlorophyll eingelagert wird.

2. Die Plastiden enthalten von Anfang an ein primäres Granum (STRUGGER 1950; 1953; 1954). Das Chlorophyll tritt beim anfänglichen Ergrünen im Stroma auf und wird sekundär in die primären bzw. in die sekundären Grana eingelagert.

3. Das Chlorophyll wird ausschließlich in den präexistierenden primären oder sekundären Grana lokalisiert. Die anfänglich sichtbare diffuse Färbung des gesamten Plastids würde dann auf optischen Effekten beruhen, und erst mit stärkerem Farbstoffgehalt kommt es auch im mikroskopischen Bild zur deutlichen Kontur und alleinigen Färbung der Grana.

Die erste Möglichkeit scheint ausgeschlossen, da in der vorliegenden Arbeit die Präexistenz des primären Granums auch in den Leukoplasten unter Beweis gestellt wurde. Die 1. Konzeption ist ferner dadurch widerlegt, daß durch Rhodamin B (Vitalfärbung), durch Quellungsversuche, durch Fixation und Färbung auch die Präexistenz der sekundären Grana in noch nicht ergrünten Plastiden nachgewiesen werden konnte. Eine klare Entscheidung zwischen der 2. und 3. Möglichkeit ist jedoch nicht eindeutig zu fällen. Spezielle Untersuchungen mit einem verbesserten Fluorescenzmikroskop müssen diese Frage noch klären.

Die Quellungsversuche der vorliegenden Arbeit bewiesen weiterhin die Existenz einer Plastidenmembran. Das vorübergehende Auftreten von Vacuolen bei Anwendung einer hypotonischen Zuckerlösung als Medium und das Quellen des Stromas bis zur Verflüssigung, das die BROWNsche Bewegung zur Folge hatte, waren nur möglich, wenn das Plastid mit dem umgebenden Cytoplasma ein osmotisches System bildet. Dieses setzt aber die Existenz einer semipermeablen Plastidengrenzschicht voraus. Die unter geeigneten Bedingungen mehrfach beobachtete Plastidenplasmoptyse bestätigte ebenfalls das Vorhandensein einer Plastidenmembran.

Wurde zur „Demaskierung" der Grana das Stroma der Leukoplasten zum Quellen gebracht, so ist mit äußerst geringen Konzentrationsunterschieden experimentiert worden, um die volle Vitalität der Plastiden zu erhalten. Beispielsweise wurde bei den Rhodamin B-Färbungen das Auftreten von vorübergehenden Vacuolen auf eine zu große Diffusionsgeschwindigkeit zurückgeführt, als beginnende pathologische Veränderung angesehen und die betreffende Versuchsreihe abgebrochen. Auf Grund dieser Erfahrungen kommt der Verfasser zu der Ansicht, daß bei

den Versuchen DRAWERTs (1954), Leukoplasten in der Epidermiszelle von *Allium cepa* vital zu färben, die Plastiden sich nicht mehr in einem lebensfähigen Zustand befanden. Das Vorhandensein der Plasmaströmung allein läßt keinen vollgültigen Schluß auf die Vitalität der Plastiden zu. Die von DRAWERT gezeichneten Leukoplasten (1954, Abb. 2) deuten in ihren bizarren Formen und der starken Vacuolisierung auf einen fortgeschrittenen Entmischungszustand hin. Im mikroskopischen Bilde waren sicher die Chondriosomen nicht mehr sichtbar und würden so den postvitalen Entmischungszustand bestätigen. Daß es sich bei dem Verschwinden der Vacuolen um einen reversiblen Vorgang handelt, ist experimentell von DRAWERT nicht analysiert. Vermutlich handelt es sich um einen fortschreitenden Vorgang der Plastidenentmischung, in deren Verlauf es zum Verschwinden der Vacuolen kommt. Dieses würde dann mit den beschriebenen Endstadien der Quellungsvorgänge bei den Plastiden der Wurzeln von *Iris* und *Vicia Faba* in Übereinstimmung stehen. Nach diesen Ausführungen ist es verständlich, daß DRAWERT nicht die empfindlichen Grana in den Leukoplasten der Epidermiszelle von *Allium cepa* nachweisen konnte und zu anderen Ergebnissen als PERNER (1954) kommen mußte. PERNER wies Grana in den Leukoplasten bei *Allium cepa* mit dem Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskop in vivo und am fixierten und gefärbten Zellmaterial nach und belegte dies mikrophotographisch.

SCHIMPER berichtete wiederholt, daß die einzelnen Pflanzen sich auch durch die Größe ihrer Grana unterscheiden. HEITZ (1936b) beschrieb eine unterschiedliche Granagröße für die einzelnen Gewebe des Laubblattes. Ferner wies er auf die verhältnismäßig großen Grana der Schattenpflanzen hin. Seit WIESNER (1876) und STÖHR (1879) ist bekannt, daß eine starke Lichtintensität die Zerstörung des Chlorophylls bewirkt. Diese Autoren führten die Chlorophyllosigkeit von Epidermiszellen auf Belichtungseinflüsse zurück. STÖHR (1879, S. 110) sah die oberen Blattepidermen „als Chlorophyllschutzmittel für die tiefer liegenden Gewebe" an. Es herrschen in den einzelnen Geweben unterschiedliche Beleuchtungsverhältnisse und sicher ein dementsprechender Pigmentspiegel, der vermutlich auch die Granagröße beeinflußt.

Bei den Ergrünungsversuchen an der *Vicia-Faba*-Wurzel zeigten die Grana ebenfalls eine veränderliche Größe. Es muß allerdings offengelassen werden, ob es sich hier um einen optischen Effekt handelte und mit zunehmendem Pigmentgehalt nur die Konturen deutlicher hervortraten oder ob das Granum in seinen Ausmaßen einen Spielraum besitzt und die Farbstoffmenge somit die Gestaltung beeinflußt. Mit zunehmender Ergrünung trat im Plastid eine festere Anordnung der Grana ein. Es erweckte den Anschein, als ob die die Grana tragenden Elemente gestrafft würden. Die bis dahin labil im Stroma vorgefundenen Grana

zeigten jetzt eine sich allmählich herausbildende geldrollenförmige Anordnung. Nicht nur am gesamten Plastid, sondern auch an den einzelnen Grana war in diesem Stadium eine Profilstellung ohne experimentellen Eingriff mikroskopisch analysierbar. Vermutlich sind in diesem Zustand die „Trägerlamellen" in den Plastiden so herausgebildet, wie sie STRUGGER (1947; 1951) für die Chloroplasten durch die Aufblätterungsversuche mit Kaliumrhodanid wahrscheinlich machte. Die Richtigkeit der im STRUGGERschen Chloroplastenmodell dargestellten intergranulären Lamellen wurde elektronenmikroskopisch durch die Arbeit von FINEAN, SJÖSTRAND u. STEINMANN (1953) bestätigt. In diesem Zusammenhang ist die Frage zu stellen, ob die Trägerlamellen sich bei der Metamorphose der Leukoplasten zu Chloroplasten neu herausbilden oder präexistierende, granatragende Elemente umgebildet werden. Dieser Fragenkomplex ist auch von GRAVE (1954) bei der Erörterung der strukturellen Entwicklung der Chloroplasten ausgehend vom monogranulären Proplastid erörtert worden. — Für eine experimentelle Lösung des Problemes dürften elektronenmikroskopische Untersuchungen an ausgewachsenen Leukoplasten während ihrer Metamorphose zu Chloroplasten von größtem Interesse sein.

Nach SCHIMPERs Auffassung handelt es sich bei den verschiedenen Differenzierungsformen der Plastiden um „gleichartige Plasmagebilde", die sich nur in ihrem Pigmentgehalt unterscheiden. Um nun diese Hypothese auch im Hinblick auf das granuläre System zu bestätigen, ist neben einer Erweiterung und Sicherung der vorliegenden Ergebnisse noch die Bearbeitung der Chromoplasten und Leukoplasten in den oberirdischen pflanzlichen Organen erforderlich. Es liegen in der Literatur mehrere Mitteilungen vor, die auch hier eine Bestätigung der granulären Struktur erwarten lassen. Nur folgende Hinweise auf einige Arbeiten sollen angeführt werden:

1. Es liegt nahe, daß ZIMMERMANNs (1893) „Leukosomen" in den Leukoplasten der Epidermis von *Tradescantia discolor* den Grana gleichzusetzen sind.

2. VAN WISSELINGH (1914, S. 375) berichtete: „In den zungenförmigen Blüten von *Gazania splendens* kommen große, orangefarbige Plastiden vor, in welchen man Kügelchen beobachtet, die in fortdauernder Bewegung sind."

3. Bei den Leukoplasten des Perciarpes von *Symphoricarpus racemosus* konnte STRUGGER (1937b) mit Rhodamin B im vitalen Zustand kleine „granaähnliche" Gebilde nachweisen, die bei Verflüssigung des Stromas in BROWNsche Bewegung gerieten.

4. PERNER (1952, S. 63; 1954) hat bei den Leukoplasten der Epidermis von *Allium cepa* Grana beobachtet.

Dagegen haben HEITZ u. MALY (1953) Grana in den Leukoplasten der Blattflügelepidermis von *Agapanthus* nicht nachweisen können.

Unter der Voraussetzung, daß diese Beobachtung gesichert ist, wäre hierzu auszuführen:

1. Seit STÖHR (1879) wissen wir, daß aus den Chloroplasten in der oberen Blattepidermis durch stärkere Belichtung Leukoplasten werden können. Von *Bellis perennis* berichtete STÖHR, daß die Plastiden in der oberen Blattepidermis durch jahreszeitliche Schwankungen der Beleuchtungsintensität manchmal als Chloroplasten und manchmal als Leukoplasten anzutreffen sind. Er führte die Untersuchungen am natürlichen Standort durch und beobachtete im Frühjahr und Herbst Chloroplasten, im Sommer dagegen nur Leukoplasten. Bei anderen Pflanzen traten nach dem Chlorophyllabbau nie wieder Chloroplasten in Erscheinung, sondern nur Leukoplasten, die in ihrer Form kleiner und abgerundet waren.

2. MONTFORT (1953) deutete auf starke Zerstörung der Plastidenpigmente durch Sonnenstrahlung und in einer späteren Phase auf Veränderungen des Plastidenstromas und des Cytoplasmas hin. FASSE (1954) hat durch Bestrahlungseffekte an etiolierten Plastiden des Mesophylls vom *Agapanthus*blatt eine Desorganisation des granulären Systems hervorgerufen. Die übrigen Zellbestandteile erlitten hierbei keine offensichtlichen Einbußen ihrer Vitalität. Die desorganisierten Plastiden wurden weiter vom strömenden Plasma mitgeführt.

Nach den Ergebnissen dieser Autoren liegt es nun durchaus im Bereich des Möglichen, daß Leukoplasten der Epidermis, die direkt aus Proplastiden oder durch eine Metamorphose aus Chloroplasten sich entwickeln, eine strukturelle Veränderung erfahren können. Es erhebt sich somit die Forderung, die Einflüsse, denen die Plastiden somatischer Zellen im Laufe ihrer Entwicklung unterlegen waren, zu berücksichtigen oder die Frage nach der Kontinuität des granulären Systems im meristematischen Gewebe zu entscheiden.

Für die Leukoplasten in den Wurzeln der untersuchten Pflanzenarten konnte SCHIMPERs Kontinuitätslehre voll bestätigt werden. Es sind im Meristem monogranuläre Proplastiden, im somatischen Gewebe polygranuläre Leukoplasten und ihre Metamorphose zu polygranulären Chloroplasten beobachtet.

III. Untersuchungen am fixierten und mikrotomierten Gewebe.

1. Bemerkungen zur Präparationsmethode.

Neben den Beobachtungen am lebenden Material wurde gleichzeitig versucht, die Grana der Leukoplasten auch in fixierten und mikrotomierten Längsschnitten nachzuweisen. Es erfolgte deshalb zunächst eine Untersuchung über das Verhalten der Plastiden in den einzelnen Stufen, die sie bis zur Anfertigung von Mikrotomschnitten nach der Paraffinmethode zu durchlaufen hatten. Als Testobjekt dienten die Plastiden aus rhizombürtigen *Iris*-Wurzeln, da diese Plastiden im natürlichen Zustand optisch analysierbare Grana aufweisen.

Die guten Erfahrungen, die MEYER (1883), HEITZ (1936a) und STRUGGER (1951) bei der Fixation von Chloroplasten mit Osmiumtetroxyd gemacht hatten, gaben Veranlassung, ebenfalls dieses Fixierungsmittel anzuwenden. Zur Festlegung der Fixierungszeiten für die jeweiligen Objekte gab die von TELLYESNICZKY (1926, nach ROMEIS 1948) gemessene Eindringungsgeschwindigkeit einer 2%igen OsO_4-Lösung einen Anhaltspunkt. Die von TELLYESNICZKY angegebenen Werte für das tierische Gewebe (1 bis 2,5 mm in 4 Std.) konnten im allgemeinen unterschritten werden, da ein pflanzliches Gewebe auf Grund der stärker ausgeprägten Zellmembranen eine leichtere Durchdringungsmöglichkeit aufweist. Es wurden 1 bis 2 mm dicke Wurzelscheibchen fixiert und durch Längsschnitte nochmals halbiert oder gevierteilt. Da die Fixierungsflüssigkeit von allen Seiten eindrang, genügte eine Fixationsdauer von 10 bis 15 min.

An Handschnitten (längs) wurden nun die Güte der Fixation und die morphologische Veränderung der Plastiden in den weiteren Stufen der Einbettungsmethode geprüft. Hierbei ergab es sich, daß das Wurzelspitzenmeristem eine äußerst starke Schwärzung aufwies und für eine mikroskopische Auswertung unbrauchbar war. Bei den somatischen Geweben ergaben sich Schwierigkeiten beim Fixieren von intercellularenreichem, älterem Gewebe. Diese Präparate enthielten nur Plastidentrümmer, insbesondere wenn dem Plastidenstroma noch Stärkekörner eingelagert waren. Vermutlich kam es zu diesen Schädigungen, weil das osmotische System, das die Plastiden mit dem umgebenden Cytoplasma bildeten, starken Konzentrationsschwankungen unterworfen war, bevor es zur Fixation kam. Denn Wasser und Fixierungsmittel wiesen unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten auf. Erst als durch Zusatz von nichtreduzierendem Zucker (Mercks Saccharose puriss. pro injectione) die Konzentration der Fixierungsflüssigkeit in Isotonie zu der vorher ermittelten Zellsaftkonzentration gebracht war, wurden in allen Geweben, außer im Wurzelspitzenmeristem, befriedigende Ergebnisse erzielt.

Die bei der Anwendung der Paraffinmethode nicht zu umgehende Entwässerung des Gewebes führte zu irreversiblen Schrumpfungen, so daß die Granulierung der *Iris*plastiden nicht mehr zu deuten war. Ferner führte die anschließende Xylolbehandlung zu weiteren morphologischen Veränderungen. Die Paraffinmethode erwies sich also für die vorliegende Fragestellung als ungeeignet. Es kam daher die Gelatine-Gefrierschnittmethode nach HERINGA u. TEN BERGE (1923) zur Anwendung, da dieses Verfahren die lipoidhaltigen Strukturen der Plastiden erhielt und Schrumpfungen vermied.

Zur Erhaltung der Quellfähigkeit des Plasmas war eine ausreichende Gelatinedurchtränkung der Objekte Voraussetzung. Ausschlaggebend hierfür war neben der Qualität der Gelatine vor allem eine sorgfältige Zubereitung der Lösung. Ein etwa halbstündiges Quellen der Gelatine mußte unbedingt eingehalten werden, bevor sie durch Temperaturerhöhung zur Lösung gebracht wurde. Die Lösungstemperatur der Gelatine (37°) durfte bei allen Manipulationen (Lösen, Filtrieren, Durchtränken im Thermostaten und Herauslösen aus den Schnitten) nur um 1 bis 2° überschritten werden.

Eine ausgiebige Durchtränkung in einer 10%igen Gelatinelösung wurde zur Regel gemacht. Je jünger das Gewebe war, desto länger (bis zu 12 Std.) mußten im allgemeinen die Objekte in dieser niedrigen Konzentrationsstufe belassen werden. In den höheren Konzentrationen reichte meist ein Verweilen von $1^1/_2$ bis 2 Std. aus. Das Durchtränken der Objekte erfolgte in geschlossenen Wägegläschen, um eine Konzentrationserhöhung zu vermeiden. Auch das Erkalten fand deshalb in abgedeckten und mit Vaseline abgedichteten „Salznäpfchen" statt.

Die Gelatine-Gefrierschnitte zeichneten sich durch eine außerordentlich leichte Färbbarkeit aus. Wäßrige Farblösungen von Rosanilin, Viktoriablau, Toluidinblau und Neutralrot kamen in einer Verdünnung bis zu 1:300000 zur Anwendung.

Oft trat schon nach einer Anfärbungszeit von 10 min eine nicht mehr differenzierbare Überfärbung ein. Es genügten also wesentlich kürzere Färbungszeiten. Mit Aqua destillata oder auch in niedrigen Alkoholstufen (bis zum 50%igen Alkohol) konnte differenziert werden, ohne daß wesentliche morphologische Änderungen sichtbar wurden. — Bei einem Einschließen der Schnitte in Lävulose-Gelatine-Balsam nach HERINGA (1931; nach ROMEIS 1948) diffundierte der Farbstoff jedoch nach einiger Zeit in den Balsam hinein, so daß die Anfärbung, insbesondere da es sich um eine elektive Färbung handelte, nicht von längerer Dauer war. Lediglich mit Neutralrot im schwach alkalischen Milieu gefärbte Präparate waren über eine längere Zeitspanne haltbar.

2. Auswertung der Gelatine-Gefrier-Mikrotomschnitte aus dem somatischen Gewebe der Wurzel und des Rhizoms von Iris germanica.

In den Schnitten aus rhizombürtigen Wurzeln und dem Rhizom von *Iris germanica* ließen sich in den Plastiden die Grana mit den oben angeführten Farbstoffen elektiv anfärben. Die Neutralrotfärbung bei einem p_H-Wert von 7,2 sprach wiederum für die stärkere Lipoidhaltigkeit der Grana (s. Neutralrotanalyse bei STRUGGER 1949). Im weiteren konnten die Grana mit einer 0,5%igen Kalilauge zum Quellen (STRUGGER 1951) und schließlich nach einem längeren Verweilen in der Lauge zur vollständigen Auflösung gebracht werden.

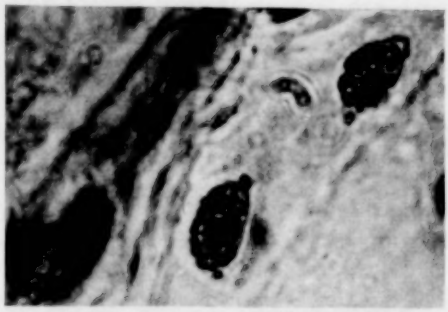


Abb. 18. Die Grana der abgebildeten Plastiden sind mit KOH zum Quellen gebracht. Das rechte Plastid zeigt einige durch KOH - Quellung vergrößerte Grana; im linken sind die Löcher, die vollständig aufgelöste Grana hinterlassen haben, sichtbar. (Rhizombürtige *Iris*wurzel, Längsschnitt aus dem Rindenparenchym; mit OsO_4 fixiert, 10 μ dicker Gelatine-Gefrierschnitt; Panphot mit Plattenkamera von E. Leitz; Vergrößerung etwa 2000mal.)

Eindeutig konnte an den Präparaten, wie es auch die Mikrophotographie zeigt (Abb. 18), die „rosenkranzartige Anordnung" der Grana bestätigt werden. Die von DE REZENDE-PINTO (1948b) beschriebene spiralige Anordnung der „Chloroplastonemen" wurde bei den untersuchten *Iris*arten nicht beobachtet. Wie die Herausbildung von Stärkekörnern die Lage der Granareihen verschieden beeinflußt, veranschaulichen die Abb. 19—22. Es ist deshalb ungünstig, an Hand von Stärke führenden Plastiden, wie es beim Rhizom von *Iris* und ebenso bei der Knolle von *Solanum tuberosum* der Fall ist, Aussagen über die strukturelle Anordnung der Granareihen im Plastidenstroma zu machen.

DE REZENDE-PINTO (1948a, S. 38; 1952, S. 337) hat die Ontogenese der Chloroplasten nach Lichtexposition beim *Iris*-Rhizom in einem Schema zusammengefaßt. Aus diesem soll folgende Entwicklungsreihe

wiedergegeben werden: Proplastid → Leukoplast → Amyloplast → Amylo-Oleoplast → Oleoplast → Chloroplast. DE REZENDE-PINTO beschränkte seine Untersuchungen auf Plastiden des Rhizoms. In den rhizombürtigen Wurzeln wurde aber beobachtet, daß alle Jungplastiden, bevor sie Stärkekörner enthielten, polygranulär waren und mit zunehmendem Alter eine zunehmende Anzahl von Grana aufwiesen. Der Nachweis, daß es sich hier um scheibchenförmige, pigmenttragende

Abb. 19.

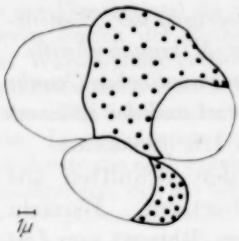


Abb. 20.

Abb. 21.

Abb. 22.

Abb. 19 u. 20. Die in Abb. 19 photographierte Plastidengruppe ist in Abb. 20 zeichnerisch erläutert. Die Grana sind mit Kalilauge zum Quellen gebracht und mit Neutralrot bei pH 7,2 elektiv gefärbt. Am linken Rand des Plastids mit den 2 größeren Stärkekörnern läßt sich die reihenförmige Anordnung der Grana erkennen. (Längsschnitt aus dem *Iris*-rhizom, 15 μ dick; Vergrößerung etwa 1600 mal; sonstige Präparation s. Abb. 18.)

Abb. 21 u. 22. Ein mit 2 Stärkekörnern beladenes Plastid zeigt die Mikrophotographie in Abb. 21. In Abb. 22 ist dasselbe Plastid nach seiner mikroskopischen Analyse gezeichnet. Die reihenförmige Anordnung der Grana ist wiederum deutlich sichtbar. (Längsschnitt aus rhizomnahem Gewebe einer *Iris*wurzel; Präparation s. Abb. 18.)

Grana handelte, wurde schon im Kapitel I beschrieben. Ein Stadium, welches dem „Amyloplasten-Stadium" im Sinne von DE REZENDE-PINTO entsprach, ist weder in rhizombürtigen Wurzeln noch im Rhizom beobachtet worden. Der bei DE REZENDE-PINTO (1948a; Tafel X, Fig. 1) mikrophotographierte „Amyloplast" wird als vom Plastidenkörper gänzlich entblößtes, außerhalb der Zelle liegendes Stärkekorn angesehen. Denn nach behutsamer Anfertigung von vitalen und auch fixierten und mikrotomierten Schnitten aus dem Rhizom waren in unversehrten Zellen nie derartige „Amyloplasten" zu ermitteln, sondern nur mit Stärkekörnern beladene polygranuläre Plastiden, wie sie schon bei SCHIMPER (1880; 1885) und MEYER (1883) beschrieben und von STRASBURGER

(1884, S. 68) zeichnerisch wiedergegeben wurden. Wohl ist in vitalen Längsschnitten beobachtet, wie der Plastidenkörper durch leichte mechanische Schädigungen zerriß und das Stärkekorn dann anschließend entblößt im strömenden Cytoplasma lag. Derselbe Effekt ließ sich auch mit einer unvorsichtig durchgeführten Plasmolyse erzielen. Derartige Zellen, in denen der Kern, die Sphärosomen, die Chondriosomen und die Plasmaströmung noch ein normales Aussehen zeigten, konnten mehrere Wochen in vitro in diesem Zustand am Leben erhalten werden. Es ist somit nicht möglich, DE REZENDE-PINTOS Hypothese von den Lipoidtropfen enthaltenden „Oleoplasten" und das von diesen abgeleitete Entwicklungsschema der Chloroplasten im Rhizom von *Iris* zu bestätigen.

3. Auswertung der Gelatine-Gefrier-Mikrotomschnitte aus dem somatischen Gewebe der Vicia-Faba-Wurzel.

In den mikrotomierten Präparaten der *Vicia-Faba*-Wurzel fanden die am lebenden Material gemachten Beobachtungen ihre Bestätigung. Die Leukoplasten wiesen eine polygranuläre Struktur auf. Teilweise waren die Grana durch eine leichte von OsO_4-Fixation herrührende Schwärzung bereits ohne Färbung zu erkennen. Sie ließen sich aber noch mit Kernfarbstoffen und Neutralrot im schwach alkalischen Milieu stärker herausfärben. Jedoch konnte ein bestimmtes Prinzip ihrer Anordnung nicht ermittelt werden. Die Abb. 23 stellt einen Ausschnitt aus dem Gewebe der Stärkescheide in Zone I (Zoneneinteilung s. Abb. 13) der Hauptwurzel dar. Der *Vicia-Faba*-Keimling war 16 Tage alt. Am lebenden Material gelang es erst nach langem Bemühen, Zellen der Stärkescheide im Längsschnitt zu erhalten, bei denen die Stärkekörner nicht von den Plastiden entblößt waren. Dies erforderte sehr behutsames Präparieren und sofortiges Einlegen in eine zum Zellsaft isotonische Zuckerlösung. Die wiedergegebene Mikrophotographie zeugt also auch von der Leistungsfähigkeit der angewandten Präparationsmethode.

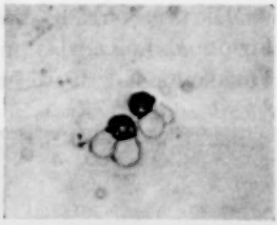


Abb. 23. Die Leukoplasten in der Stärkescheide sind mit 2 und mehr, oft bis zu 5 Stärkekörnern bestückt. Die zahlreichen im Plastidenstroma liegenden Grana sind mit Neutralrot bei PH 7,2 elektiv gefärbt. (*Vicia-Faba*-Keimling, Längsschnitt 12 μ dick, Gelatine-Gefrierschnitt; Panphot von E. Leitz; Vergrößerung etwa 1500mal.)

4. Bemerkungen zur Präparation der Wurzelspitzenmeristeme.

Bei der Fixation meristematischen Gewebes der Wurzeln von *Vicia Faba* und *Iris* mit einer 2%igen OsO_4-Lösung traten derartig starke Schwärzungen auf, daß jegliche Auswertung der Schnitte unmöglich war. Bleichungsversuche nach KOPSCH, BOWEN und LUSTGARTEN-POL (nach ROMEIS 1948) mit Lösungen von

Wasserstoffperoxyd, Kaliumpermanganat in Verbindung mit Kaliumsulfit und Oxalsäure führten zu starken morphologischen Veränderungen. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, wurden zwei verschiedene Wege beschritten, einmal wurde ein anderes Versuchsobjekt und zweitens ein anderes Fixierungsmittel gesucht.

Unter einer wahllos herausgegriffenen Reihe von Pflanzen stellte sich heraus, daß die *Begonia*-Wurzeln eine wesentlich geringere Schwärzung aufwiesen als die Wurzeln von *Iris* und *Vicia Faba*.

Für die weiteren Versuche wurden *Begonia Scharffiana*, *B. ulmifolia* und *B. undulata* in einer Nährlösung nach SHIVE (1915; nach BAUMEISTER 1952) kultiviert, damit die zarten Wurzeln besser zugänglich und von allen erdigen Bestandteilen befreit waren. Etwa 1 mm lange Wurzelspitzen kamen halbiert mit einer 2%igen OsO_4-Lösung zur Fixation. Nach einer Einwirkungsdauer von 3 bis 5 min erhielten die Objekte neben Gewebepartien, die bereits zu stark geschwärzt waren, Zellkomplexe, die eine ausreichende Fixation aufwiesen und eine Auswertung zuließen.

Beim Versuch anderweitiger Fixierungsmittel wurde auf die Erfahrungen von STRUGGER (1954) und GRAVE (1954) zurückgegriffen und mit dem Fixationsgemisch nach LEWITZKY im Meristem von *Iris* und *Vicia Faba* brauchbare Ergebnisse erzielt.

5. Auswertung der Gelatine-Gefrier-Mikrotomschnitte aus dem Wurzelspitzenmeristem von Begonia, Iris und Vicia.

Die Auswertung dieser Präparate erfolgte mit dem „Ortholux" der Firma E. Leitz, das mit dem Objektiv „Fl.Öl 114/1,32" und einem Variokolor-Kondensor ausgestattet war.

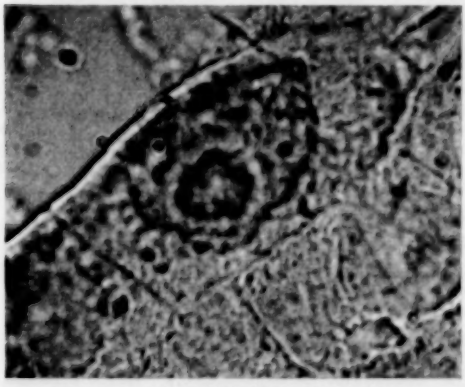


Abb. 24.

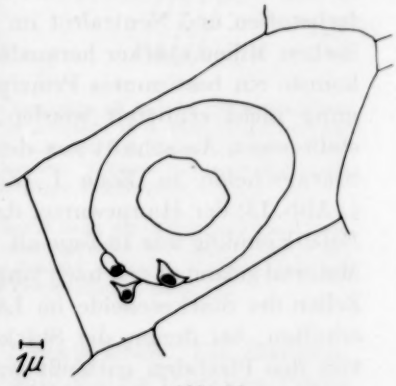


Abb. 25.

Abb. 24 u. 25. Die in Abb. 25 nach einer mikroskopischen Analyse gezeichneten Proplastiden sind in Abb. 24 mikrophotographiert. Der 5 μ dicke Längsschnitt stammt aus dem Wurzelspitzenmeristem von *Vicia Faba*, das nach LEWITZKY fixiert war. Die elektive Färbung wurde mit Rosanilin erreicht. (Leica mit Mikas $^1/_3$mal von E. Leitz; Variokolor-Kondensor, Grünfilter; Vergrößerung etwa 1200mal.)

In den meristematischen Zellen, in denen bei den 5 μ dicken Gelatine-Gefrier-Längsschnitten die Plastiden führende Schicht miterfaßt wurde, waren Proplastiden zu erkennen, die meist dem Zellkern auflagen. Die Umrißlinien der Proplastiden waren sehr vielgestaltig und ließen auf

eine starke Amöboidie im Leben schließen. Die gemessenen größten Längen variierten zwischen 1,2 μ und 2,4 μ, so daß die Proplastiden sich eindeutig von den Chondriosomen unterscheiden ließen. Die Gestalt der Chondriosomen zeigte sich ferner beständiger als die der Proplastiden.

In allen Proplastiden war ein primäres Granum mit basischen Farbstoffen wie Viktoriablau, Rosanilin, Toluidinblau stärker anfärbbar. Die Anordnung des Granums im Stroma war sehr unterschiedlich.

Wie schon erwähnt, fanden parallel zu dieser Auswertung Untersuchungen an gleichwertigen, vitalen Längsschnitten statt. Die Ergebnisse beider Untersuchungen stimmten überein und sollen mit den in den Abb. 16, 24 und 25 wiedergegebenen Mikrophotographien und Zeichnungen belegt werden.

Zusammenfassung.

A. Die Leukoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzel waren das Hauptversuchsobjekt. Die erhaltenen Ergebnisse gelten auch für die Plastiden der Wurzel folgender Pflanzen: *Ranunculus Ficaria*, *Begonia Scharffiana*, *B. ulmifolia*, *B. undulata*, *Oxalis Acetosella*, *Ricinus communis*, *Pisum sativum*, *Allium cepa* und *Helianthus annuus*. Auch die Chromoplasten der Wurzel von *Iris germanica*, *I. florentina* und *Daucus carota* wurden auf das Vorkommen von Grana untersucht. Bei allen beobachteten Objekten fand Schimpers Theorie der Plastidenmetamorphose auch im Hinblick auf eine Kontinuität der Grana ihre Bestätigung. Im einzelnen liegen folgende Ergebnisse vor:

1. Die Leukoplasten im somatischen Gewebe der *Vicia-Faba*-Wurzel enthalten „optisch maskierte Grana". Diese werden sichtbar, sobald zwischen den Lichtbrechungsindices des Stromas und der Grana ein sprunghafter Unterschied besteht. Ein solcher läßt sich durch Quellung des Stromas erreichen. Durch Färbung mit Rhodamin B oder durch eine nach Lichtexposition erfolgte Pigmentsynthese werden die Grana ebenfalls sichtbar.

2. Leukoplasten, in denen die Grana durch Quellung hervortreten, werden nach Entquellung wieder optisch homogen. Diese Plastiden weisen weiterhin die Fähigkeit auf, aus Glucose Stärke zu kondensieren.

3. Im fixierten und mikrotomierten somatischen Gewebe der *Vicia-Faba*-Wurzel konnte ebenfalls eine polygranuläre Struktur in den Leukoplasten durch Farbkontraste mit Kernfarbstoffen (Rosanilin, Viktoriablau, Toluidinblau) und durch eine elektive Neutralrotfärbung (bei p_H 7,2) nachgewiesen werden.

4. Bei den Plastiden im Rhizom und in den Wurzeln von *Iris* handelt es sich um Chromoplasten. Da diese Carotinoide enthalten, sind die Grana ohne experimentellen Eingriff im Gewebelängsschnitt sichtbar.

5. Die Chromoplasten in jungen Wurzeln von *Daucus carota* sind ebenfalls polygranulär.

6. Mit dem Plastidenalter nimmt die Anzahl der Grana zu. Der aufgezeigte Gradient fordert die Existenz eines monogranulären Stadiums.

7. Das Primärgranum ist nach Quellung des Stromas der Proplastiden im Wurzelspitzenmeristem von *Vicia Faba* in vivo beobachtet worden. Im fixierten und mikrotomierten meristematischen Gewebe von *Vicia Faba*, *Iris germanica* und *Begonia undulata* sind die primären Grana durch eine stärkere Färbung mit Kernfarbstoffen nachgewiesen. Die Proplastiden der Wurzel gleichen somit in ihrer Struktur denen in den Meristemen der oberirdischen Organe (STRUGGER 1950; 1953; 1954).

B. Weitere Ergebnisse beziehen sich auf den Aufbau der Plastiden:

1. Bei Beobachtung einer Plastidenplasmoptyse läßt sich die Scheibchennatur der Grana feststellen, sofern diesen eine ausreichende Pigmentmenge eingelagert ist.

2. Licht induziert die Ausbildung der Linsenform, die für Chloroplasten typisch ist. Mit dieser Gestaltsänderung läuft eine Chlorophyllsynthese parallel.

3. Bei der Metamorphose von Leukoplasten zu Chloroplasten ist die Herausbildung der geldrollenartigen Anordnung der Grana (STRUGGER 1951) bestätigt worden.

Literatur.

BAUMEISTER, W.: Mineralstoff und Pflanzenwachstum. Jena 1952. — BELZUNG, E.: Recherches morphologiques et physiologiques sur l'amidon et les grains de chlorophylle. Ann. Sci. Nat. Bot. **5**, 179 (1887); **7**, 5 (1891). — BOEHM, J.: Beiträge zur näheren Kenntnis des Chlorophylls. Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. **22** (1856). — Über Stärkebildung aus Zucker. Bot. Ztg. **41**, 33, 49 (1883). — BOKORNY, TH.: Über Stärkebildung aus verschiedenen Stoffen. Ber. dtsch. bot. Ges. **4**, 116 (1888). — CRÜGER, H: Westindische Fragmente. Bot. Ztg. **41** (1854). — CZAPEK, F.: Zum Nachweis von Lipoiden in Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **37**, 207 (1919). — DEHNECKE, K: Über nicht assimilierende Chlorophyllkörner. Diss. Bonn 1880. — DRAWERT, H.: Vitalfärbung der Plastiden von Allium cepa mit Coelestinblau. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 33 (1954). — FASSE, U.: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei Agapanthus umbellatus. Diss. Münster 1954. — FIEDLER, H.: Entwicklungs- und reizphysiologische Untersuchungen an Kulturen isolierter Wurzelspitzen. Z. Bot. **30**, 385 (1936). — Die pflanzliche Gewebe- und Organkultur. (Sammelreferat.) Z. Bot. **33**, 369 (1938). — FINEAN, J. B., F. S. SJÖSTRAND and E. STEINMANN: Exper. Cell Res. **4**, No 4 (1953). — GAUTHERET, R. J.: Sur la culture d'extrémités de racines. C. r. Soc. Biol. Paris **109**, 1236 (1932). — Caractères anatomiques et cytologiques des tranches d'endivie, salsifis et topinambour cultivées in vitro. C. r. Soc. Biol. Paris **135**, 1161 (1941). — GICKLHORN, J.: Vorübergehende Formveränderungen von Plastiden während der Plasmolyse. Protoplasma (Wien) **15**, 71 (1932). — GRAVE, G.: Untersuchungen über die Chloroplastenstruktur und ihre Entwicklung bei Agapanthus

umbellatus. Diss. Münster 1954. — HABERLANDT, G.: Über die Entstehung der Chlorophyllkörner in den Keimblättern von Phaseolus vulgaris. Bot. Ztg **35**, 378 (1877). — HEITZ, E.: Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten. (Vorl. Mitteilung.) Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 362 (1936a). — Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. Planta (Berl.) **26**, 134 (1936b). — HEITZ, E., u. R. MALY: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforsch. 8b, 243 (1953). — HERINGA, G. C., u. B. S. TEN BERGE: Eine Gelatine-Gefrierschnittmethode für die Anfertigung mikroskopischer Präparate. Z. wiss. Mikrosk. **40**, 166 (1923). — JACOBSON, L.: Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylene diamine tetraacetate. Plant Physiol. **26**, 411 (1951). — JUNGERS, V., et J. DOUTRELIGNE: Sur la localisation de la chlorophylle dans les chloroplastes. Cellule **49**, 39 (1943). — KÜSTER, E.: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. Jena 1951. — LOPRIORE, G.: Über Chlorophyllbildung bei partiärem Lichtabschluß. Ber. dtsch. bot. Ges. **22**, 385 (1904). — MEYER, A.: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig 1883. — Untersuchungen über die Stärkekörner. Jena 1895. — MIKOSCH, C.: Untersuchungen über die Entstehung der Chlorophyllkörner. Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl., **78**, Abt. I, 265 (1878). — Über die Entstehung der Chlorophyllkörner. Bot. Cbl. **23**, 298 (1885). — MOHL, H. v.: Untersuchungen über die anatomischen Verhältnisse des Chlorophylls. Diss. 1837. (Auszug in: Vermischte Schriften botan. Inhaltes. Tübingen 1845.) — Über den Bau des Chlorophylls. Bot. Ztg **13**, 89, 105 (1855). — MOLISCH, H.: Mikrochemie der Pflanze, 3. Aufl. Jena 1923. — MONTFORT, C.: Photochemische Wirkungen der langwelligen Hälfte des Sonnenspektrums auf Chlorophyllspiegel und Lebenszustand photolabiler Assimilationsgewebe. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 4 (1953). — MULDER, G. J.: Versuch einer allgemeinen physiologischen Chemie. (Deutsche Ausgabe: Braunschweig 1844—1851, 2 Bde.) 1830. — PERNER, E. S.: Zellphysiologische und cytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in Allium-Epidermiszellen. Biol. Zbl. **71**, 43 (1952). — Zum mikroskopischen Nachweis des primären Granums in den Leukoplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 26 (1954). — POTTER, M. C.: On the developement of starch grains in the lactiferous cells of the Euphorbiaceae. Linnean Soc. J. Bot. **20**, 446 (1884). Ref. Bot. Cbl. **18**, 531 (1884). — QUEKETT, E. J.: Ann. Mag. Nat. Hist. 18, 32 (1846).—REZENDE-PINTO, M. C. DE: O problema da origem dos plastidos. Brotéria (C. N.) **17**, 5 (1948a). — Sur la structure hélicoïdale des chloroplastes. Portugal. Acta Biol. A **2**, 111 (1948b). — Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. Protoplasma (Wien) **41**, 3 (1952). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948. — SACHS, J.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Bildung des Amylums in den Chlorophyllkörnern. Bot. Ztg **12**, 44 (1862). (Auszug in: Gesammelte Abhandlungen über Pflanzen-Physiologie. Bd. I. Leipzig 1892). — Handbuch der Experimentalphysiologie der Pflanzen. Leipzig 1865. — SCHIMPER, A. F. W.: Untersuchungen über die Entstehung der Stärkekörner. Bot. Ztg **38**, 881 (1880). — Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. Bot. Ztg **41**, 105 (1883). — Untersuchungen über Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. Jb. wiss. Bot. **16**, 1 (1885). — Sur l'amidon et les leucites. Ann. Sci. nat., VII. s. Bot. **5**, 77 (1887). — SIEBERT, A.: Ergrünungsfähigkeit bei Wurzeln. Beih. bot. Cbl. **37** (I) 185 (1920). — STÖHR, A.: Über das Vorkommen von Chlorophyll in der Epidermis der Phanerogamen-Laubblätter. Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl., Abt. I **79** (1879). — STRASBURGER, E.: Botanisches Praktikum. Jena 1884. — STRUGGER, S.: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von

Helodea mit Rhodaminen. Flora (Jena) **131**, 113 (1937a). — Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. Flora (Jena) **131**, 324 (1937b). — Die Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. Z. Naturforsch. **2b**, 146 (1947). — Praktikum der Zell- uud Gewebephysiologie der Pflanze, 2. Aufl. Berlin 1949. — Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. (Vorl. Mitteilung.) Naturwiss. **37**, 166 (1950). — Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. **64**, 69 (1951). — Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 10 (1953). — Die Proplastiden in den jungen Blättern von Agapanthus umbellatus L'Hérit. Protoplasma (Wien) **43**, 1 (1954). — Tswett, M.: Das Chloroglobin. Bot. Zbl. **81**, 81 (1900). — Wiesner, J.: Die natürlichen Einrichtungen zum Schutze des Chlorophylls in der lebenden Pflanze. Festschrift der bot.-zool. Ges. Wien 1876, S. 39. — Winkler, H.: Untersuchungen über die Stärkebildung in den verschiedenartigen Chromatophoren. Jb. wiss. Bot. **32**, 525 (1898). — Wisselingh, C. van: Über den Nachweis und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze. Flora (Jena) **107**, 371 (1914). — Zimmermann, A.: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. Tübingen 1893.

Die Herausgeber finden die Termini polygranulär und monogranulär unschön und würden lieber die nichthybriden Bildungen multigranulär und unigranulär verwendet sehen.

Abgeschlossen im April 1954.

Dr. Fritz Bartels,
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut),
(20a) Voldagsen üb. Elze.

Planta, Bd. 45, S. 455—469 (1955).

Aus dem Botanischen und dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.

ÜBER DEN HISTOCHEMISCHEN NACHWEIS DER AN DER VERHOLZUNG BETEILIGTEN β-GLUCOSIDASEN.

Von

HANS REZNIK.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Februar 1955.)

I. Einleitung.

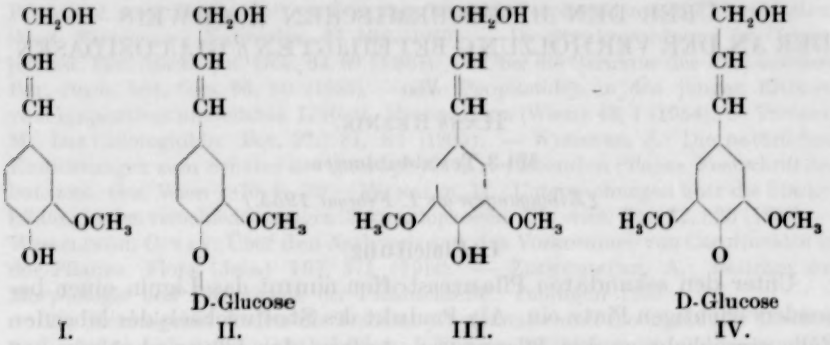
Unter den sekundären Pflanzenstoffen nimmt das Lignin einen besonders wichtigen Platz ein. Als Produkt des Stoffwechsels der lebenden Zelle ermöglicht es der Pflanze den Aufbau der Leitungsbahnen und Stützgewebe, ohne welche die Landpflanzen niemals die kormophytische Organisationsstufe erreicht hätten. In den letzten Jahren sind bei der Konstitutionsaufklärung dieses heteropolymeren Stoffes wichtige Erkenntnisse gewonnen worden, die nicht nur auf den Bau des Ligninmoleküls Bezug nehmen, sondern auch Einblick in Teilschritte der Biosynthese des Lignins sowie der Verholzung überhaupt erlauben.

In den letzten 3 Jahrzehnten hat die Phenylpropan-Theorie nicht zuletzt dank der ausgedehnten Forschungen K. FREUDENBERGs allgemeine Anerkennung gefunden. In vivo wie in vitro ist es gelungen, aus den postulierten Ligninvorstufen, die die Synthese dem Chemiker in die Hand gab, Dehydrierungs-Polymerisate zu gewinnen, die in ihren Eigenschaften kaum noch vom nativen „gewachsenen" Lignin differieren (FREUDENBERG 1954a, 1954b).

Zwischen den Gymnospermen und den Angiospermen besteht hinsichtlich der chemischen Struktur der Ligningrundkörper ein fundamentaler Unterschied. Bei den Gymnospermen (Ausnahmen s. unten) ist lediglich der Coniferylalkohol (I) (3-Methoxy-4-oxyzimtalkohol) als Bauelement des Lignins nachgewiesen. Dieser Stoff ist jedoch nicht in freier Form im Gewebe vorhanden, sondern findet sich als β-Glucosid Coniferin (II) im Cambialgewebe und in den gerade verholzenden, noch lebenden Tracheiden. KRATZL (1948) gelang es zu zeigen, daß das Aglucon als Zellgift wirkt. Wie in vielen anderen Fällen fungiert demnach auch hier die Glucosidierung als Entgiftungsmechanismus. Als Glucosid ist der Coniferylalkohol auch gegen den Angriff der Zellredoxasen unempfindlich.

Im Lignin der Angiospermen spielt der Coniferylalkohol eine mehr untergeordnete Rolle. Der Hauptanteil des Laubholz-Lignins entstammt der Sinapinalkohol-Komponente (III) (3,5-Dimethoxy-4-oxyzimtalko-

hol). Das in der Cambialregion nachgewiesene β-Glucosid des Sinapinalkohols führt den Namen Syringin (IV). Die ersten exakten Untersuchungen über die spezifischen Unterschiede zwischen Laubholz- und



I. II. III. IV.

Nadelholz-Lignin stammen von HOLMBERG (1934). Er fand, daß bei den Pteridophyten vor allem die Filicinae und Lycopodinae beträchtliche Mengen mit dem Fichtenlignin identischer Produkte zu bilden imstande sind. Auch gelang es ihm, die biochemische Sonderstellung der Gattung *Ephedra* (s. unten) nachzuweisen.

Wendet man die Nitrobenzol-Oxydationsmethode nach FREUDENBERG, LAUTSCH und ENGLER (1940) an, so wird die Coniferylalkohol-Komponente des Lignins zu Vanillin, die Sinapinalkohol-Komponente zu Syringaaldehyd abgebaut. Der Abbau der Nadelhölzer ergibt nach dieser Technik nur Vanillin. CREIGHTON, GIBBS und HIBBERT (1944) nahmen die Nitrobenzoloxydation bei 21 Gymnospermen, 26 Dicotyledonen und 7 Monocotyledonen vor, um die Methode auf ihre Brauchbarkeit bei der Entscheidung taxonomischer Fragen zu prüfen. Aus der von den genannten Autoren publizierten sehr interessanten Tabelle seien einige charakteristische Beispiele angeführt:

Tabelle 1.

Pflanzenname	Vanillin %	Syringaaldehyd %	Vanillin / Syringaaldehyd	Mäule-Test
Cycas revoluta	2	—	—	—
Picea glauca	23,5	—	—	—
Pinus strobus	18,0	—	—	—
Sequoia sempervirens . . .	23,5	—	—	—
Podocarpus amarus. . . .	12,5	12,5	1:1	+ bis ++
Ephedra trifurca	9,3	27,7	1:3	+++
Gnetum indicum	6,8	10,5	1:2,5	++
Welwitschia mirabilis . . .	2,0	2,4	1:1,2	+
Fraxinus americana	10,5	37,2	1:3,5	+++
Ulmus fulva	9,0	29,1	1:3,2	+++
Liriodendron tulipifera . .	11,0	36,5	1:3,2	+++

Aus dem Ergebnis lassen sich die Verschiedenheiten in der Struktur des Nadelholz- und Laubholz-Lignins eindeutig ableiten. Von großem Interesse für den Systematiker ist das Verhalten einiger Arten aus der Gattung *Podocarpus*, die bereits Sinapinalkohol-Anteile aufweisen. Die *Gnetales* gar besitzen reines Laubholz-Lignin! Von vielen Systematikern wird diese isoliert stehende Gruppe als Übergangsglied zu den Angiospermen aufgefaßt. So hat neuerdings LAM (1947) ein viel beachtetes System der Kormophyten entwickelt, in welchem er die *Gnetales* zusammen mit den *Verticillatae* (*Casuarina*) als Protangiospermae den übrigen Angiospermen gegenüberstellt. Es ist durchaus angebracht, den bisher üblichen morphologisch-anatomischen Argumenten (Blattnervatur, Holzanatomie u. a.) nun auch das auf den Bauplan des Lignins gegründete biochemische Argument anzufügen. Nach den oben geschilderten Resultaten ist die Zuordnung der *Gnetales* zu den Protangiospermen nicht unbegründet. Die in Botanikerkreisen nicht genügend bekanntgewordene Arbeit von CREIGHTON, GIBBS und HIBBERT weist noch ein weiteres interessantes Ergebnis auf. Von der MÄULEschen Ligninreaktion war schon seit langem bekannt, daß sie bei Coniferen versagt. Die in der vorstehenden Tabelle aufgeführten Daten erweisen einwandfrei, daß der Test nur bei Anwesenheit der Sinapinalkohol-Komponente positiv reagiert. Die lange ungeklärt gebliebene Funktion des Mäule-Testes ist damit aufgedeckt. Die Reaktion läßt sich geradezu als spezifischer Nachweis für den Sinapinalkohol-Anteil des Holzes verwenden. Sie übertrifft damit an Spezifität die WIESNERsche Phloroglucin-Reaktion bei weitem, wie eine Nachprüfung auch an Heidelberger Material ergab.

Wie oben dargetan, liegt der Coniferylalkohol, bzw. Sinapinalkohol in den pflanzlichen Geweben in β-glucosidischer Bindung vor. Bevor diese Grundkörper im Verlaufe des Verholzungsprozesses polymerisiert werden, müssen sie ihrer Bindung an den Zucker entledigt sein. Es ist nach FREUDENBERG (1949) anzunehmen, daß am Orte der Verholzung eine β-Glucosidase die enzymatische Freisetzung des Aglukons bewirkt. Das am Verholzungsprozeß beteiligte Fermentsystem ist seit einigen Jahren Gegenstand von Untersuchungen, die am Heidelberger Chemischen und Botanischen Institut vorgenommen werden. Über die ersten Ergebnisse ist 1952 von FREUDENBERG, REZNIK, BOESENBERG und RASENACK eine Mitteilung erschienen. Der vorliegenden Publikation fällt die Aufgabe zu, etwas ausführlicher über die Nachweisreaktionen zu berichten, die eine Histotopographie der Verholzungsglucosidasen ermöglichen. Untersuchungen über die Histochemie der für die Ligningenese weit wichtigeren Zell-Redoxasen sind im Gange.

II. Pflanzenmaterial.

Da die Bemühungen um die Aufklärung der Biogenese des Lignins vorläufig vor allem den Nadelhölzern gelten, wurde auch bei den vorliegenden histochemischen Studien das Schwergewicht auf die Coniferen gelegt. In allen Monaten des Jahres, also zu den Zeiten der Vegetationsruhe ebenso wie zu den Zeiten des Wachstums erfolgten die im methodischen Teil beschriebenen Teste an den Objekten. Untersucht wurden vor allem ein- bis mehrjährige lebende Sprosse von *Pinus silvestris*, *Pinus montana* und *Picea excelsa*. Außerdem wurde als sehr brauchbares Standardobjekt die Norfolktanne (*Araucaria excelsa*) herangezogen, die unter Gewächshausbedingungen auch im Winter guten Holzzuwachs zeigte. Von Laubhölzern wurden nach einigem Probieren die *Oleaceen* für geeignet befunden. Sie sind, wie die Ergebnisse von CREIGHTON, GIBBS und HIBBERT deutlich machen, prototypisch für den Besitz des Laubholzlignins.

Zahlreiche weitere Nadel- und Laubgehölze wurden in Vorversuchen auf Vorhandensein und Lokalisation der zur Frage stehenden Fermente hin untersucht. Von Fall zu Fall wird von ihnen zu berichten sein.

III. Der Glucosidasen-Nachweis nach der Indican-Methode.

Es seien kurz die Voraussetzungen für eine einwandfreie histochemische Enzymlokalisation erörtert. Eine Hauptschwierigkeit aller Methoden, die den Ort der enzymatischen Spaltung in lebenden Strukturen exakt zu bezeichnen versuchen, liegt darin, daß die Reaktionsprodukte rasch durch Diffusion und Strömung verlagert werden können. Die cytoplasmatischen Strukturen, an oder in denen sich der Spaltungsvorgang vollzieht, werden dann übersehen, weil Anhäufungen der Spaltprodukte an sekundären Orten eine verfälschte topographische Situation ergeben. Von einem in der enzymatischen Histochemie brauchbaren Reagens ist zu verlangen, daß die Reaktionsprodukte sogleich am Spaltungsort abgefangen und in einer wenig transportablen, am besten unlöslichen Form sistiert werden. Dabei sollte das Produkt auch der visuellen Beobachtung zugänglich sein. Diese Voraussetzungen erfüllt das farblose Pflanzen-Indican (Indoxyl-β-D-glucosid) in sehr guter Weise (BEIJERINCK 1900, FREUDENBERG, REZNIK, BOESENBERG u. RASENACK 1952, HOLT 1952). BEIJERINCK war der erste, der indicanhaltige Pflanzensäfte als Emulsin-Reagens anwandte.

Die enzymatische Freisetzung des Indoxyls erfolgt, wie aus von CRAMER (1952) angestellten manometrischen Messungen des Spaltungsverlaufs hervorgeht, merklich langsamer als die oxydative Bildung des unlöslichen Farbstoffes Indigo. Dieser Umstand ist für die Lokalisationsschärfe von Bedeutung. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß das Spaltungsprodukt selbst als gefärbter Spaltungs-Indicator fungiert. Damit erübrigt sich die bei den meisten anderen Nachweisreaktionen notwendige Zugabe eines färbenden Prinzips, die oft erst nach — viele Fehlermöglichkeiten einschließenden — Umwegen möglich ist (siehe z.B. die GOMORI-Reaktion).

Ähnliche Erwägungen haben auch HOLT (1952) veranlaßt, sich mit der Anwendung von Indoxylderivaten bei der histochemischen Darstellung von Hydrolasen zu befassen. Er bot der Cholinesterase an Stelle des natürlichen Substrates Acetylcholin das ähnlich strukturierte 0-Acetyl-Indoxyl. Auch hier erfolgte nach der enzymatischen Freisetzung des Esters die Bildung von Indigo.

Application. Das synthetisch hergestellte Indican (FREUDENBERG, REZNIK, BOESENBERG und RASENACK 1952) wurde in wäßriger Lösung (20 mg/ml) aufgebracht; zum Teil wurden auch auf p_H 5,5 eingestellte Phosphatpuffer verwendet. Die Lösung ist bei Zimmertemperatur nur 20 Std haltbar und trübt sich unter

allmählicher Indigobildung. Für jede Versuchsreihe wurde sie deshalb neu angesetzt. Da Rinde und Cambium der verwendeten Coniferen ein p_H von 5,1—5,5 zeigten, mußte die Stabilität des Indicators in schwach saueren Lösungen nachgeprüft werden, um eine Reaktion durch einen nichtfermentativen Prozeß (Säurehydrolyse u. a.) auszuschalten. Photometrische Messungen (PULFRICH-Photometer) von mit Indican versetzten Pufferlösungen ergaben, daß in einem p_H-Bereich zwischen 5,0—7,0 eine nur langsame Hydrolyse erfolgt (Abb. 1).

Von den lebenden Sprossen wurden Querschnittscheiben angefertigt, von denen immer je 10 eine Dicke von 25 μ, 100 μ, 1 mm und 5 mm hatten. Die Schnitte wurden in Petrischalen eingelegt, deren Boden mit Rundfiltern ausgekleidet war. Appliziert wurde mit einer Mikropipette auf die obere noch frische Schnittfläche. Je nach den Dimensionen des Schnittes wurden 0,005—0,05 ml Glucosidlösung aufgebracht. Die Petrischalen wurden bei 24° C bis zum Sichtbarwerden des gebildeten Indigos (10 bis 300 min) bebrütet. Ausgewertet wurde bei Zimmertemperatur (22—24° C) unter einer binocularen Lupe oder unter dem Mikroskop bei Auf- und Durchlicht. Jede Serie enthielt auch Kontrollschalen mit Objekten ohne Indicanbehandlung. Bei anderen Kontrollversuchen wurden die Schnitte 60 min lang auf 90° C erhitzt, um die Enzyme abzutöten. Derartige Präparate ergaben sämtlich auch nach 48stündiger Beobachtung keinen Indigo-Effekt.

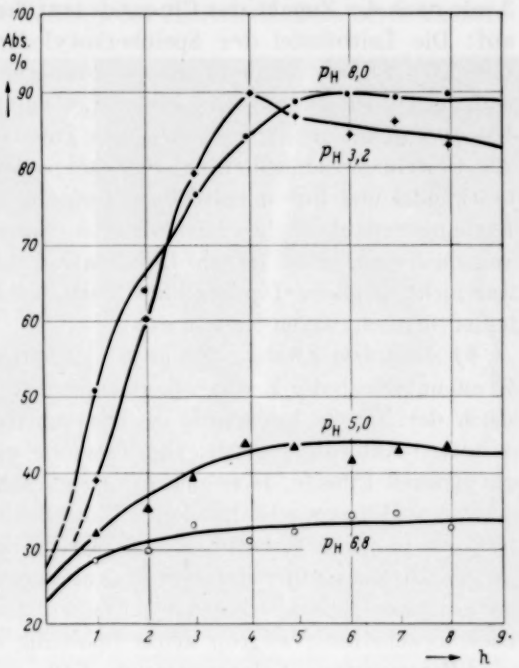


Abb. 1. Stabilität einer 2%igen Indoxylglucosid-Lösung in Abhängigkeit vom p_H. Neunstündige Beobachtungsserien. Pulfrichphotometer Filter S4.

IV. Einzelversuche.

a) Samen von Amygdalus communis. Es würde gewissermaßen eine Probe aufs Exempel darstellen, die Lokalisation des Emulsins der Mandelkerne mit Hilfe der Indicanspaltung kennenzulernen. Ein solcher Versuch wurde, wie bereits erwähnt, 1900 von dem um die Indigoforschung verdienten M. W. BEIJERINCK angestellt. Er betupfte Gewebeschnitte von Mandeln mit indicanhaltigem Pflanzenpreßsaft aus *Indigofera leptostachya* und *Polygonum tinctorium* bei einer Spaltungstemperatur von 55° C. Als erste Gewebe färbten sich die Leitbündel

des Embryos tiefblau. Einige Zeit später wurden auch die benachbarten Parenchymzellen von der Färbung erfaßt.

Eigene Vorversuche, die ohne Kenntnis der Arbeit von BEIJERINCK angesetzt wurden, stimmten mit dem oben beschriebenen Ergebnis überein. Die Mandeln wurden median oder transversal halbiert und nach Indicanaufsprühung in eine feuchte Kammer gebracht. Bereits 3 min nach der Zugabe des Glucosids trat der erste deutliche Farbeffekt auf: Die Leitbündel der Speicherkotyledonen und der die Plumula bildenden Primärblätter erschienen blaugrün gefärbt. Sehr viel schwächer zeigte sich die Färbung in den Leitbündeln des Hypokotyls. Nach 10—20 min hat die Färbung ihre volle Intensität erreicht. Es erscheinen alle Gewebe einschließlich des Speicherparenchyms tief dunkelblau; die Leitbündel und ihre unmittelbare Umgebung sind schwarzviolett. Der Färbungsverlauf ist bei lufttrockenen Samen derselbe wie bei leicht angequollenen. Eine feinere Lokalisation des primären Spaltungsortes war nicht möglich. Der gebildete Farbstoff kristallisierte schließlich in feinen blauschwarzen Nadeln aus.

b) Araucaria excelsa. Einige 5—12jährige Araucarien wurden etwa 40 cm unterhalb der Endknospe dekapitiert. Das abgetrennte Terminalstück der Sproßachse wurde in Querscheiben zerlegt und auf β-Glucosidasen-Aktivität geprüft. Die Versuche ergaben sommers wie winters die gleichen Effekte, da es sich um Gewächshauspflanzen mit $\pm$ gleichmäßigem Holzzuwachs handelt. Eine Spaltung des Indoxylglucosids trat nur in jenen Sproßteilen auf, die in Verholzung begriffen waren. Die unmittelbar unter der Sproßspitze liegenden halbmeristematischen unverholzten Bezirke (Zonen der Procambiumstränge und des primären Dickenwachstums) zeigten keine Spaltung an. Die Zone der bereits ausdifferenzierten Xylemprimanen ließ jedoch schwache Fermentaktivität erkennen.

Etwa 6—10 cm unterhalb der Terminalknospe trat erstmalig eine ringförmige blaue Zone auf, die dem unreifen, vom Cambium gebildeten Xylemmantel entsprach. Der Mantel besitzt eine durchschnittliche Stärke von 3—8 Zellen je Radialreihe. Die Spaltungsanzeige erfolgt in diesen jungen Sproßteilen nach etwa 140—180 min. Ein wesentlich klareres Bild ergibt die Beobachtung von Schnitten aus 20—40 cm Scheitelabstand. Dort hat der sekundäre Holzzuwachs bereits größere Ausmaße erreicht. In 20 cm Entfernung vom terminalen Vegetationspunkt bestehen die Radialreihen aus 10—15 Tracheiden, in 25 cm Entfernung aus 20—24 Tracheiden und in 40 cm Entfernung aus etwa 80 Tracheiden. Von den Zellen einer Radialreihe sind jeweils die 6—8 dem Cambium benachbarten noch nicht endgültig verholzt. Sie befinden sich in sehr verschiedenen Stadien der Differenzierung und Membranbildung. In diesen unreifen noch lebenden Tracheiden kann

aktive β-D-Glucosidase nachgewiesen werden, wie das Erscheinen eines tief dunkelblauen Indigo-Ringes bereits nach 30—70 min zeigt (Abb. 2). Eine histologische Wiedergabe dieses Effektes befindet sich in der eingangs zitierten Arbeit aus dem Jahre 1952 (FREUDENBERG, REZNIK, BOESENBERG u. RASENACK, S. 642).

Bei näherer Untersuchung des Farbringes zeigt es sich, daß die dem Cambium benachbarten 5—8 Zellen jeder Radialreihe besonders intensiv

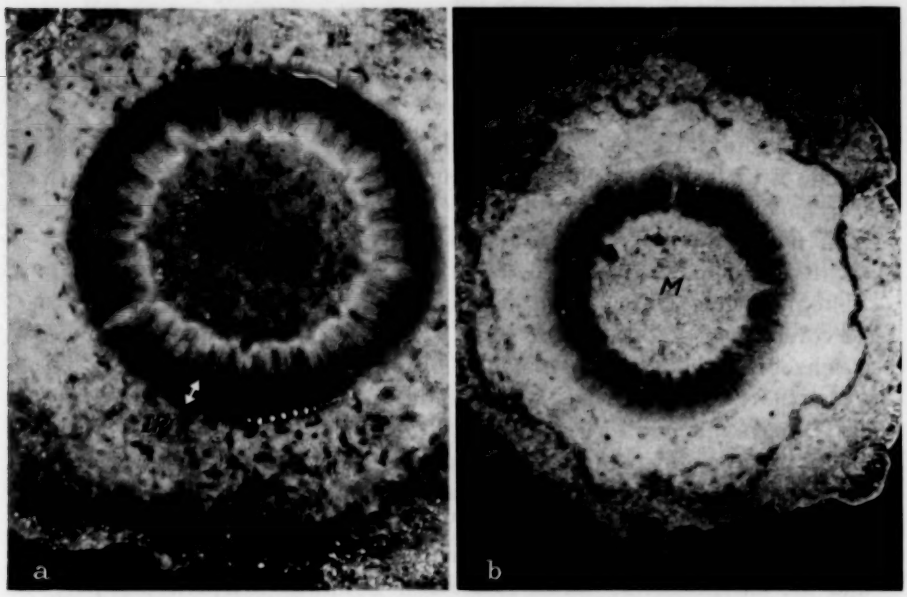


Abb. 2a u. b. a Auflichtphotographie eines Sproßquerschnittes von Araucaria excelsa. Die Zone der verholzenden Jungtracheiden läßt den Indigo-Effekt erkennen. (Vergr. 16×.) b Kontrollschnitt, mit Phloroglucin-Salzsäure behandelt. *M* Mark; *IR* Indigoring.

gefärbt sind. Im Mikroskop weisen besonders die Zellwände eine gleichmäßig dunkelblaue Tingierung auf. Auch im Plasma sind gefärbte granuläre Strukturen zu erkennen. Nach einiger Zeit kristallisiert der Farbstoff in diffus über das mikroskopische Gesichtsfeld verteilten Nadeln aus.

Die Färbung zeigt zwar mit großer Klarheit auf, in welchen Gewebebezirken aktives Enzym gegeben ist; die Methode versagt aber, wenn man eine feinere cytologisch detaillierte Lokalisierung der Enzymaktivität anstrebt. Die starke Tingierung z.B. der Membranen muß nicht unbedingt auf einen primären Reaktionsort hindeuten. Es könnte auch eine elektroadsorptive Bindung des Indigomoleküls an die Zellwand in Betracht gezogen werden, wie folgender Versuch nahelegt: Ein $1^1/_2$ cm langes Sproßstück wurde mit Indican infiltriert. Nach

3 Std war an beiden Enden ein starker Indigo-Ring sichtbar. Das Sproßstück wurde in der Mitte quer geschnitten. Am Holzkörper war dort infolge O_2-Mangels die Bildung eines blauen Farbstoffes unterblieben. Man dürfte nun erwarten, daß die ungefärbten löslichen Reaktions-Zwischenprodukte inzwischen durch Diffusion verlagert sind. Die nun nachträglich einsetzende Färbung sollte nicht distinkt lokalisiert sein, sondern mehr oder weniger über den Schnitt verwaschen erscheinen. Dem ist aber nicht so. Die durch Oxydation entstehende Farbzone unterscheidet sich in Intensität und Lokalisationsschärfe nicht von den Bildern des Normalversuches. Dieser Umstand deutet auf elektroadsorptive Bindung des Reaktionsproduktes an gewisse Zellbestandteile (Membranen) hin.

Auch die Harzgänge in Holz und Rinde zeigen einen deutlichen Indigo-Effekt. Insbesondere erscheint das Plasma der zartwandigen Harzgangepithelzellen dicht gefärbt. Entsprechende Befunde lassen sich auch bei sämtlichen anderen untersuchten Nadelhölzern erheben. Die Coniferen-Harze enthalten beträchtliche Anteile an Guajacylpropan-Abkömmlingen. Unter diesen sog. Lignanen ist vor allem das Pinoresinol hervorzuheben (TSCHIRCH 1900), ein Dimeres des Coniferylalkohols, das gleichzeitig auch als Baustein des Fichtenlignins auftritt (FREUDENBERG 1954). Was nun die Biogenese derartiger Phenylpropanderivate des Harzes anlangt, so liegt es nahe, dieselben Syntheseschritte anzunehmen, wie sie für die Ligninbildung bereits als gesichert gelten können (FREUDENBERG 1954, FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT 1955). Auch die enzymatischen Teilreaktionen, die Freisetzung des Coniferylalkohols aus dem D-Coniferin durch spezifische β-D-Glucosidasen und die anschließende durch Redoxasen bewirkte Dehydrierungspolymerisation verlaufen in den harzerzeugenden Gewebebezirken.

c) Pinus silvestris, Pinus montana. Die einheimischen Freiland-Coniferen unterscheiden sich von der Norfolk-Tanne darin grundlegend, daß bei ihnen aktives glucosidspaltendes Enzym nur während der Zeit des Holzzuwachses, also von Ende April bis höchstens Mitte August nachweisbar ist. Aus zur Zeit der Vegetationsruhe oder im Spätsommer angestellten Versuchen resultiert keine Indigo-Reaktion. Da andere Enzyme auch außerhalb der Wachstumszeit in aktivem Zustand angetroffen werden können, z.B. die an der Terminalatmung beteiligten Chromooxydasen (noch unveröffentl. Vers.), so bietet diese Kongruenz zwischen Holzzuwachs und Fermentaktivität einen weiteren Anhaltspunkt für die enzymatische Freisetzung des Coniferylalkohols.

In den Sproßquerschnitt-Testen tritt der erste sichtbare Effekt durchschnittlich 40—140 min nach der Aufbringung des Indicans auf. Am meisten intensiv ist die Färbung in den Epithelzellen der Harzgänge sowohl des Holzes als auch der primären Rinde. Auch im Mark-

strahlparenchym sind Glucosidasen vorhanden. Wiederum besonders deutlich ist die Indigo-Reaktion im Bereiche des Holzkörpers. Es ist jedoch die bei *Araucaria* zu beobachtende strenge Beschränkung auf ausschließlich junge noch wachsende Tracheiden nicht gegeben. In einjährigen Sprossen mit einem Holzzuwachs von 40—80 Zellen je Radialzug sind auch ältere dem Cambium fernere Bezirke gefärbt, ohne daß Diffusion angenommen werden muß. Manchmal sind auch die dem Mark benachbarten Xylemprimanen gefärbt.

Bei einigen Versuchen wurde an den Sproßstücken die primäre Rinde, das Phloem und Teile des Cambiums durch Schälen entfernt. Auch in solcherart entrindeten Holzkörpern fiel die Indigo-Reaktion positiv aus.

d) Picea excelsa. Ein zur Zeit des intensivsten Wachstums (Mitte Mai) vorgenommener Versuch ergab gegenüber *Araucaria* und *Pinus* keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Enzym- und Spaltungslokalisation. Die Stärke des Farbeffektes deutet jedoch auf sehr intensive Spaltung hin. Der Xylemring war tief rotviolett tingiert, was nur bei starker Indigo-Konzentration der Fall ist. In den Harzgängen der Rinde war der Effekt weniger stark (Indigotönung himmel- bis tiefblau). Auch bei der Fichte endeten sämtliche zur Zeit der Wachstumsruhe unternommenen Versuche negativ.

e) Die Indigo-Reaktion bei Laubhölzern. Nach den Angaben von Creighton, Gibbs und Hibbert (1944) sind an der Zusammensetzung des Laubholzlignins 3 Hauptkomponenten beteiligt (Coniferylalkohol, Sinapinalkohol und p-Cumaraldehyd). Von den beiden ersten Stoffen sind die Glucoside (Coniferin, Syringin) bekannt. Auch vom p-Cumaraldehyd könnte eine glucosidische Stufe angenommen werden. Das an der Ligninbiogenese beteiligte Fermentsystem wird sich demnach kaum wesentlich von den Coniferen-Fermenten unterscheiden (Siegel 1954). Bei Styrax benzoin ist als Sonderfall ein Teil des Coniferylalkohols als Benzoat in der Pflanze festgelegt (Freudenberg und Bittner 1950).

Die Indigo-Reaktion bietet bei Gewebeschnitten von dicotylen Holzgewächsen keine bemerkenswerten Unterschiede zu den bereits an Coniferen eruierten Tatsachen. Wir können es uns ersparen, die Phänomene im einzelnen zu besprechen. Eine kurze Tabelle mag über einige Versuche Auskunft geben (Tabelle 2):

Die Farbreaktion zeigt je nach Alter und Wachstumszustand des Sprosses gewisse Nuancen in der Reaktionsdauer und Intensität. Auch hier weisen ruhende Sprosse durchweg negative Reaktion auf. So zeigt z. B. der am 30. Juli untersuchte Fliedersproß (Versuch Nr. 5) auch äußerlich kein Wachstum mehr. Hingegen wies der positiv reagierende *Ilex*-Sproß vom 4. August (Versuch Nr. 6) eine lebhaft wachsende Triebspitze auf. Das jahreszeitlich bedingte negative Reagieren in den Versuchen 3, 4, 8, 12 und 15 ist ohne weiteres zu verstehen. Bei der im

Tabelle 2.

Nr.	Species	Datum	Indigo-Reaktion	Farbstoffbildung nach	Lokalisation	Farbton
1	*Syringa vulgaris*	6. 2.	+	—	—	—
2	*Syringa vulgaris*	19. 3.	—	—	—	—
3	*Syringa vulgaris*	17. 4.	+	180 min	Cambiumnahes Xylem	hellblau
4	*Syringa vulgaris*	20. 5.	++	100 min	Cambiumnahes Xylem	hellblau
5	*Syringa vulgaris*	30. 7.	—	—	—	—
6	*Ilex aquifolium*, 1jährig	4. 8.	+++	20—60 min	Unreifes Xylem, 6—8 Zellen je Radialzug, wie 1jähriger Trieb	schwarzblau
7	*Ilex aquifolium*, 2jährig	4. 8.	+++	30—60 min	—	tiefblau
8	*Ilex aquifolium*, 2jährig	11. 9.	—	—	—	—
9	*Forsythia suspensa*	6. 2.	(+)	80 min	Gesamter Holzkörper	schwach hellblau
10	*Forsythia suspensa*	23. 6.	+++	30—50 min	Unreifes Xylem	tiefblau
11	*Fraxinus ornus*	11. 4.	+	200 min	Cambiumnahes Xylem	grünlichblau
12	*Fraxinus ornus*	10. 10.	—	—	—	—
13	*Ficus exasperata* (Gewächshauspflanze!)	19. 12.	++	240 min	Cambium stärker als Xylem gefärbt	tiefblau
14	*Corylus avellana*	11. 4.	+	200 min	Gesamter Holzkörper	grünlichblau
15	*Corylus avellana*	4. 9.	—	—	—	—
16	*Salix longifolia*	11. 4.	+	180 min	Unreifes Xylem	blau
17	*Rosa rugosa*	14. 5.	—	—	—	—
18	*Pirus communis*	14. 5.	—	Starke Melaninbildung durch Gewebe-Redoxasen verdeckt schwachen Indigo-Effekt		
19	*Evonymus radicans*	18. 4.	++	90 min	nur Phloem (Xylem bleibt ungefärbt)	tiefblau

Dezember positiv reagierenden *Ficus exasperata* (Nr. 13) handelt es sich um eine im Wachstum begriffene Warmhauspflanze.

Abweichend von allen übrigen Beispielen verhält sich *Evonymus radicans* (Nr. 19). Hier ist ausschließlich das Phloem tingiert. Vollständig versagt hat die Indigo-Probe vor allem bei *Rosaceen* (Nr. 17, 18). Bei *Pirus communis* allerdings mag es sein, daß die zu beobachtende starke Bräunung des Schnittes durch die Tätigkeit der Redoxasen den möglicherweise nur schwachen Indigo-Effekt maskiert. Versuche zur Ausschaltung der Redoxasenwirkung sind im Gange.

V. Über die Anwendung anderer Spaltungsindikatoren.

Der als Reaktionsprodukt auf den Schnitten erscheinende Indigo besitzt eine relativ geringe Farbkraft. Das ist bei der Auswertung der Ergebnisse im Durchlichtmikroskop, zumal bei stärkeren Vergrößerungen, sehr unvorteilhaft. Es wurde daher versucht, andere geeignete Farbreaktionen für die histochemische Enzymlokalisation zu finden. Besonders brauchbar erscheinen bestimmte bathochrom substituierte Phenolglucoside, da die Aglucon-Verbindungen nach der Hydrolyse mit Diazoniumverbindungen zu kuppeln vermögen.

a) m-Oxy-Zimtalkohol-glucosid[1]. Als Substrat für eine glucosidatische Spaltung diente das β-D-Glucosid des m-Oxy-Zimtalkohols. Die Verwendung dieser Verbindung ist schon wegen ihrer nahen Verwandtschaft mit dem Coniferin interessant. Die gelöste Substanz wurde in einem Spaltungsansatz nach Linderstrøm-Lang (Duspiva 1942) mit Enzym aus dem Kropfsaft von *Helix pomatia* zusammengebracht und bei 37° C inkubiert. Das Aglucon wurde nach Spaltungs-Sistierung mit diazotierter Sulfanilsäure in alkalischer Lösung versetzt. Das Kupplungsprodukt ist tiefbraun gefärbt. In Kontrollversuchen (Substratkontrolle) unterblieb die Kupplung. Die Methode ist in quantitativen Ansätzen besonders für colorimetrische Messungen gut geeignet. In Gewebeschnitten hingegen (*Amygdalus*, *Araucaria*) versagte die Methode, da das Reaktionsprodukt durch Diffusion verschwemmt wurde. Eine histochemische Anzeige der Enzymlokalisation, wie sie in vorliegender Arbeit angestrebt wird, ist demnach mit dieser Substanz nicht möglich. Cohen, Seligman, Rutenburg und Mitarbeiter (1952) wendeten 6-Brom-2-naphthyl-β-D-glucosid als Chromogen-Substanz an, um in Säugetiergeweben Glucosidasen cytochemisch darzustellen. Als Kupplungsreagens diente tetrazotiertes Diorthoanisidin (Handelsname: du Pont Naphthanil

[1] Herrn Prof. Duspiva (Heidelberg), der mich in die Methoden und Probleme der enzymatischen Histochemie und Papierchromatographie einführte, sage ich für seine wertvolle Mitwirkung bei den Versuchen Va und b meinen verbindlichen Dank.

Diazo Blue B). Auch diese Methode war nach den Angaben der Autoren unzureichend, da das Kupplungsprodukt verschwemmt wurde.

b) Cellobiose. (Papierchromatographischer Nachweis der Spaltungsprodukte.) Für den Nachweis der Enzymwirkung ist in letzter Zeit auch die papierchromatographische Technik häufig herangezogen worden. Sie ermöglicht es, die auf enzymatischem Wege entstandenen Spaltungsprodukte in geringsten Mengen zu erkennen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine papierchromatographische Prüfung der in den cambiumnahen Geweben lokalisierten Enzymaktivität vorgenommen. Als Substrat für den Angriff des Enzyms diente an Stelle der oben beschriebenen Heteroside (Indican, m-Oxy-Zimtalkohol-glucosid) das Holosid Cellobiose (4-β-D-Glucopyranosyl-D-Glucose). Bei Vorliegen einer β-glucosidatischen Aktivität kann das Spaltungsprodukt Glucose nachgewiesen werden. Allerdings geht gerade im Falle der Cellobiose die Spaltung nicht quantitativ vor sich, so daß noch ein größerer Anteil des unverbrauchten Substrates auf dem Chromatogramm erscheint.

Von wachsenden 1jährigen Trieben der Araukarie wurden enzymhaltige Gewebehomogenate aus „unreifen" Tracheiden gewonnen. Ein weiterer Ansatz enthielt Homogenat aus jungen Siebröhren. Die Spaltung erfolgte in einem Mikroansatz nach LINDERSTRØM-LANG (DUSPIVA 1942). Inkubiert wurde 24 Std bei 37° C. Die Reaktionsprodukte wurden dann 30 Std absteigend chromatographiert. Die Auswertung der Papyrogramme ergab, daß die unreifen Tracheiden aktive β-D-Glucosidase enthalten (Glucose-Fleck im Enzymversuch b Abb. 3). Im unbehandelten Gewebe-Homogenat (Enzymkontrolle a) wurde so gut wie keine freie Glucose gefunden, wohl aber beträchtliche Mengen Fructose, Saccharose und ein noch nicht identifiziertes Trisaccharid (Melezitose?). Das Siebröhrenhomogenat enthielt nur geringe Spuren aktiver β-Glucosidase, hingegen viel freie Glucose und Disaccharide (Abb. 3d, e). Der Cellobioseversuch ergab somit einwandfrei, daß in dem Cambial-Bezirk von *Araucaria* nur diejenigen Zellen reich an Glucosidase sind, die auch im Indican-Test positiv reagieren.

c) Versuche mit Radio-Carbon (C^{14}). Von FREUDENBERG, REZNIK, FUCHS u. REICHERT (1954a, 1955) angestellte Untersuchungen über die Aufnahme und Weiterverarbeitung 14-C-markierter Ligninvorstufen durch Fichtenbäumchen ergaben eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit den hier vorgetragenen Resultaten der Indican-Versuche. Coniferylalkohol wurde an der primären Carbinolgruppe markiert und in Form des β-D-Glucosids (D-Coniferin) den Bäumen mit Hilfe eines speziellen Imbibitionsverfahrens appliziert. Eine andere Serie von Versuchsbäumen erhielt das L-Glucosid (L-Coniferin). Analoge Versuche wurden mit markiertem D-Gluco-Vanillin und L-Gluco-Vanillin vorgenommen. Es zeigte sich, daß die Glucosidasen der Cambialregion nur die D-Heteroside

zu spalten imstande waren. Die Spaltungsprodukte wurden durch die Zellredoxasen zu Dehydrierungs-Polymerisaten von Lignincharakter verwandelt. Die L-Glucoside dagegen widerstanden dem Angriff der Enzyme und blieben wasserlöslich. Analysen ergaben, daß sie im Pflanzengewebe noch nach Monaten in ungespaltener Form vorlagen. Mikroautoradiogramme von Sproßquerschnitten zeigen als Strahlungsort eine ringförmige Zone, die in den Abmessungen (hinsichtlich Durchmesser und

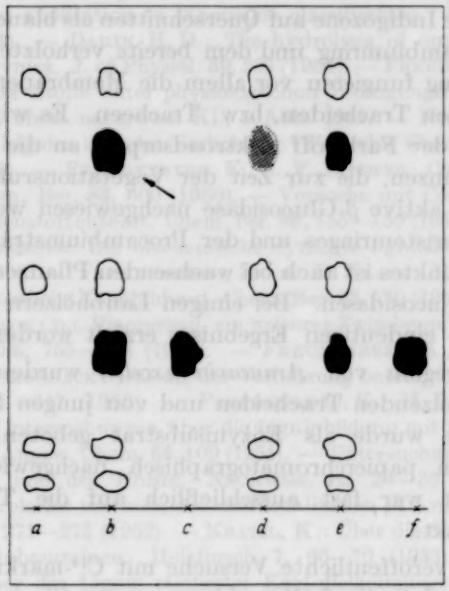


Abb. 3a—f. Papierchromatographischer Nachweis der Cellobiosespaltung. Wiedergabe der Zuckerzone eines Durchlauf-Chromatogramms. a Tracheiden-Homogenat, Enzymkontrolle; b Tracheiden-Homogenat, Spaltung. Der Pfeil weist auf die durch enzymatische Hydrolyse entstandene Glucose; c Substrat-Kontrolle; d Siebröhren-Homogenat, Enzymkontrolle (Spuren von Glucose vorhanden); e Siebröhren-Homogenat, Spaltung; f Substrat-Kontrolle.

Zonenbreite) dem blauen Indigoring entspricht, wie man ihn zur Zeit der Einbringung der radioaktiven Verbindungen mit Hilfe des Indican-Testes erhalten hätte.

Aus dem Resultat der Versuche mit C^{14} läßt sich demnach ableiten, 1. daß Coniferylalkohol als Ligninvorstufe gelten darf; 2. daß die an der Freisetzung des Aglukons beteiligten Enzyme spezifische β-D-Glucosidasen sein müssen, da ja die im Parallelversuch nicht gespaltenen L-Glucoside ebenfalls β-glucosidische Bindung aufweisen. Die Glucosidasen der Cambialzone besitzen demnach optische Spezifität (DAKIN 1904).

Zusammenfassung.

Die Indican-Methode ist geeignet, die Verteilung von β-D-Glucosidasen in lebenden Sprossen festzustellen. In Gewebeschnitten von *Araucaria excelsa*, *Pinus silvestris*, *Pinus montana*, *Picea excelsa*, *Syringa vulgaris*, *Forsythia suspensa* und anderen Nadel- und Laubhölzern erscheint die durch enzymatische Deglucosidierung des Indicans und anschließende Indigobildung auftretende Blaufärbung nur in solchen Geweben, die im Begriffe sind zu verholzen. Im sekundären Xylem („Holz") bietet sich die Indigozone auf Querschnitten als blauer schmaler Ring zwischen dem Cambiumring und dem bereits verholzten Gewebe. Als Träger der Färbung fungieren vor allem die Membranen der noch „unreifen" verholzenden Tracheiden, bzw. Tracheen. Es wird die Annahme gemacht, daß der Farbstoff elektroadsorptiv an die Zellwände gebunden ist. In Pflanzen, die zur Zeit der Vegetationsruhe getestet wurden, konnte keine aktive β-Glucosidase nachgewiesen werden. Die Zone des primären Meristemringes und der Procambiumstränge unterhalb des Vegetationspunktes ist auch bei wachsenden Pflanzen noch fast frei von Verholzungsglucosidasen. Bei einigen Laubhölzern (*Rosaceen*, *Evonymus*) sind keine eindeutigen Ergebnisse erzielt worden.

Aus der Cambialregion von *Araucaria excelsa* wurden Gewebehomogenate von verholzenden Tracheiden und von jungen Siebröhren hergestellt. Cellobiose wurde als Enzymsubstrat geboten, und die Spaltprodukte wurden papierchromatographisch nachgewiesen. Die Glucosidasen-Aktivität war fast ausschließlich auf die Tracheiden-Homogenate beschränkt.

An anderer Stelle veröffentlichte Versuche mit C^{14}-markierten Ligninvorstufen ergaben, daß die β-Glucosidasen nur D-Glucoside einzubauen vermögen.

Die topographische Übereinstimmung der untersuchten Vorgänge war bei der vergleichenden Auswertung der Indican-, Cellobiose- und Radio-Kohlenstoff-Methode sehr gut. Das Vorhaben einer exakten Enzymlokalisierung in bestimmten Gewebebezirken ist gelungen. Das weit wichtigere Ziel — die Zuordnung der Fermentaktivität zu bestimmten Zellstrukturen (Plasmagranulationen, Mitochondrien o. ä.) ist mit den geschilderten Methoden nicht zu erlangen gewesen. Vielleicht kann eine verfeinerte Methode, die sich auf die Anwendung der Gefriertrocknung stützt, die bestehenden Schwierigkeiten überwinden helfen. An der Beteiligung spezifischer Glucosidasen am Verholzungsprozeß kann jedenfalls nicht mehr gezweifelt werden.

Herrn Prof. FREUDENBERG und Herrn Prof. SEYBOLD sei auch an dieser Stelle für die fördernde Anregung und das stetige Interesse gedankt, das diese Arbeit begleitet hat.

Literatur.

Beijerinck, M. W.: On Indigo-fermentation. Proc., Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **2**, 495—512 (1900). — Brown, S. A., K. G. Tanner and J. E. Stone: Studies of Lignin Biosynthesis using Isotopic Carbon. II. Short-term Experiments with CO_2. Canad. J. Chem. **31**, 755—760 (1953). — Cohen, R. B., S. H. Rutenburg, Kwan-Chung Tsou, M. A. Woodbury and A. M. Seligman: The Colorimetric Estimation of β-D-glucosidase. J. of Biol. Chem. **195**, 607—614 (1952). — Cramer, F.: Einschlußverbindungen der Cyclodextrine. Z. angew. Chem. **64**, 136 (1952). — Creighton, R. H. J., R. D. Gibbs and H. Hibbert: Studies on Lignin and related Compounds LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification. J. Amer. Chem. Soc. **66**, 32—37 (1944). — Dakin, H. D.: The hydrolysis of optically inactive esters by means of enzymes. J. of Physiol. **30**, 253 (1904). — Freudenberg, K.: Die Bildung ligninähnlicher Stoffe unter physiologischen Bedingungen. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., 5. Abh. **1949**. — Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete des Lignins und der Verholzung. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **11**, 43—82 (1954). — Freudenberg, K., u. F. Bittner: Coniferylalkohol aus Siambenzoe. Chem. Ber. **83**, 600 (1950). — Versuche mit Coniferylalkohol, der radioaktiven Kohlenstoff enthält. Chem. Ber. **86**, 155—159 (1953). — Freudenberg, K., u. W. Heimberger: Die biochemische Synthese ligninartiger Stoffe. Chem. Ber. **83**, 519 (1950). — Freudenberg, K., u. R. Kraft: Methyliertes Fichtenlignin und seine künstliche Nachbildung. Chem. Ber. **83**, 530 (1950). — Freudenberg, K., u. D. Rasenack: D,L-Pinoresinol, ein weiteres Zwischenprodukt der Ligninbildung. Chem. Ber. **86**, 755—758 (1953). — Freudenberg, K., H. Reznik, H. Boesenberg u. D. Rasenack: Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. Chem. Ber. **85**, 641—647 (1952). — Freudenberg, K., H. Reznik, W. Fuchs u. M. Reichert: Untersuchungen über die Ligninbildung mit Hilfe C^{14} markierter Verbindungen. Angew. Chem. **66**, 109 (1954). — Untersuchungen über die Entstehung des Lignins und des Holzes. Naturwiss. **42**, 29—35 (1955). — Holt, S. J.: A new prinziple for the histochemical localization of hydrolytic enzymes. Nature (Lond.) **169**, 271—273 (1952). — Kratzl, K.: Über die Synthese von mit C^{14} markierten Ligninbausteinen. Holzforsch. **7**, 66—70 (1953). — Zur Biogenese des Lignins. Über das Lignin etiolierter Kartoffelkeimlinge. Experientia (Basel) **4**, 110—112 (1948). — Lam, H. J.: A new system of the cormophyta. Blumea **6**, 282—289 (1947). — Siegel, S. M.: Studies on the biosynthesis of Lignin. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 41—50 (1954). — Tschirch, A.: Die Harze und die Harzbehälter. Leipzig 1900. — Wacek, A. v., O. Härtel u. S. Meralla: Über den Einfluß von Coniferinzusatz auf die Verholzung von Karottengewebe bei Kultur in vitro. Holzforsch. **7**, 58—62 (1953). — Zechmeister, L., and M. Rohdewald: The detection of enzymes by the chromatographic brush method. I. Enzymologia **13**, 388—392 (1949).

Dr. Hans Reznik, Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Bergheimer Str. 1.

Planta, Bd. 45, S. 470—492 (1955).

Aus der Landes-Lehr- und Forschungsanstalt für Wein- und Gartenbau, Neustadt a. d. Weinstraße.

ÜBER DIE VOLLAUTOMATISIERUNG DER CO_2-ASSIMILATIONSBESTIMMUNG UND ZUR METHODIK DES KÜVETTENKLIMAS*.

Von

G. Bosian.

Unter Mitarbeit von A. Ensgraber.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Januar 1955.)

Die an eine Freilandapparatur zu stellenden Anforderungen sind wesentlich höher als für die zu Untersuchungen im Laboratorium bestimmten Geräte, bedingt durch die Unmöglichkeit der Konstanthaltung einzelner Umweltfaktoren und die dadurch erforderliche Vielseitigkeit der Nebenmessungen. Voraussetzung für die Auswertung von Freilandbestimmungen ist neben hoher Meßgenauigkeit die Möglichkeit zur Gewinnung lückenloser Tageskurven und besser sogar noch von Kurven, die über einige Tage hinaus Auswertungen zulassen bei gleichzeitiger Erfassung aller wichtigen klimatischen Faktoren. Wird weiterhin berücksichtigt, daß, dem Sinn ökologischer Freilanduntersuchungen entsprechend, die Versuchspflanzen am natürlichen Standort und Triebe oder Blätter im unveränderten Verband mit der Pflanze verbleiben müssen, so taucht eine weitere, und zwar wohl die größte Schwierigkeit auf: die Unterbringung der Versuchspflanze in der Assimilationskammer; denn bei langfristigen Versuchen über Tage oder gar Wochen hinaus treten in der Küvette für die Pflanze klimatische Verhältnisse auf, die von den Außenbedingungen erheblich abweichen und zu falschen Schlußfolgerungen führen. Ganz besonders hinderlich wirkt sich in dieser Hinsicht die Übertemperatur in der Küvette aus, die bei intensiver Sonnenstrahlung im Hochsommer um mehr als 25° C über die Außentemperatur hinausgehen kann (s. auch Tranquillini 1954, Harder, Filzer, Lorenz 1931).

Daß selbst bei kurzfristigen Versuchen Übertemperaturen auftreten können, ist aus der Literatur seit 1918 (Henrici u. a.) hinlänglich bekannt und ebenso die Tatsache, daß durch diese Übertemperaturen bei sonst optimalen Bedingungen der CO_2-Assimilation Depressionen im Verlauf der Assimilationskurve auftreten, die über den Kompensations-

* Nach einem Vortrag anläßlich der Botanikertagung in Hamburg am 27. 8. 53.

punkt hinausgehen und damit ausschließlich Atmung vortäuschen [Kostytschew u. Mitarbeiter (1926), Schanderl (1930), Jaccard (1930), Harder, Filzer u. Lorenz (1931), Harder, Keppler u. Reuss (1931), Hiramatsu (1932), Paauw (1932), Schoder (1932), Bosian (1933 u. 1953), Egle u. Schenk (1953) u. a. s. Tranquillini (1954)]. Den Nachweis, daß Überhitzung der Küvetten zu diesen Depressionen führt, konnte Bosian bereits 1933 durch eine recht grobe Vorkühlung der Küvetten in Kurzversuchen erbringen (Bosian 1933, S. 266—267) und mußte damit zu der Überzeugung gelangen, daß alle bisherigen Untersuchungsergebnisse über den CO_2-Stoffwechsel unter extremen Temperaturverhältnissen im Freiland zumindestens einer grundsätzlichen Nachprüfung unter Berücksichtigung des Küvettenklimas bedürfen. Dabei kann sich die einfache Kühlung durch eine wassergekühlte Doppelwandung der Küvette allein — wie Bosian es bereits 1933 für kurzfristige Versuche vorgeschlagen hatte — nicht den Anforderungen natürlicher Verhältnisse entsprechen, da sie die Schwankungen der Tagestemperaturen nicht mitmacht. Die Temperatur des Kühlwassers muß also regulierbar sein, und zwar so, daß die Küvettentemperatur der Außenlufttemperatur weitgehend angeglichen wird. Es leuchtet ein, daß diese Temperaturregelung, wenn manuell durchgeführt, eine äußerst starke Belastung für den Versuchsansteller bedeutet und trotzdem nicht befriedigend exakt funktionieren kann. Die Vollautomatisierung mußte somit angestrebt werden und fand in vorliegend beschriebener Konstruktion ihre im Prinzip recht einfache und doch erfreulich exakte Verwirklichung.

Versuche, die Übertemperaturen der Küvette durch Abschirmung der direkten Sonneneinstrahlung zu verhindern, wurden bereits von Harder, Filzer und Lorenz (1931) sowie Schoder (1932) angestrebt. Tranquillini (1954) gelang es durch Filtrierung des ultraroten Strahlenanteils in Verbindung mit Luftdurchströmungsgeschwindigkeiten von über $^1/_2$ cm/sec eine weitgehende Überhitzung der Küvette zu vermeiden. Eine Angleichung an die natürlichen Lichtverhältnisse wird aber durch dieses an sich sehr schöne und wirksame Verfahren nicht ganz befriedigend gelöst, da die schon durch die Küvette selbst bedingte Lichtminderung durch die Filtrierung noch zusätzlich erhöht wird.

Die Lichtverhältnisse in der Küvette sind durch die Wahl des Materials der Assimilationskammern — Glas oder Plexiglas — gegeben. Die Lichtdurchlässigkeit des von uns verwendeten Plexiglases beträgt je nach dem Alter bzw. der Inanspruchnahme 90—99% und genügt damit den gestellten Anforderungen.

Die relative Feuchtigkeit in der Küvette übersteigt die relative Feuchtigkeit der Außenluft erheblich und ist vorläufig noch nicht

automatisch regulierbar. Bei größeren Blättern — in unseren Versuchen Rebblätter — tritt Kondensation des transpirierten Wasserdampfes in der Küvette ein. Das entstehende Wasser kann im Verlaufe des Tages etliche Kubikzentimeter betragen und muß zwischenzeitlich aus der Küvette entfernt werden. In kleineren Küvetten mit geringer Blattfläche kann die Kondensation durch erhöhte Durchströmungsgeschwindigkeit der Luft weitgehend verringert oder eventuell vermieden werden. Die Kondensation des Transpirationswasserdampfes in der Küvette hat unsere Bemühungen, die Transpiration psychrometrisch im Assimilationsluftstrom zu bestimmen, bisher noch unmöglich gemacht[1].

Für die Registrierung der zeitlich mit den CO_2-Assimilationswerten korrespondierenden Nebenmessungen — Temperatur, Licht, relative Feuchtigkeit und Windgeschwindigkeit — sind manuelle Messungen und Ablesungen der Meßwerte nur durch einen größeren Mitarbeiterstab zu ermöglichen, selbst bei Mitverwendung des vollautomatisch arbeitenden „Uras" für die CO_2-Bestimmungen. Die Vollautomatisierung aller Nebenmessungen zur CO_2-Bestimmung einschließlich der Küvettenkühlung ist daher nicht nur wünschenswert, sondern für die Gewinnung lückenloser Kurven in zeitlicher Zusammengehörigkeit unerläßlich geworden und wurde daher bei der im folgenden beschriebenen Apparatur angestrebt und verwirklicht.

Die Gesamtapparatur gestattet die vollautomatische Registrierung der CO_2-Assimilation in Minutenwerten, Temperatur- und Lichtmessungen innerhalb und außerhalb der Küvette, sowie die Bestimmung der relativen Feuchtigkeit in 30 sec-Werten und ermöglicht weiterhin die Messung der Windgeschwindigkeit und die vollautomatische Küvettenkühlung mit einer weitgehenden Temperaturangleichung an die Außenlufttemperatur. Die Registrier- und Zusatzgeräte wurden zu einem „Fliegenden Laboratorium" zusammengestellt, das schnellen Standortwechsel und schnellen Aufbau an den Versuchsstationen gestattet.

Es ist mir ein dringendes Bedürfnis, dem Ministerium Rheinland-Pfalz meinen herzlichsten Dank auch an dieser Stelle auszusprechen für die großzügige finanzielle Unterstützung, durch die es mir ermöglicht wurde, meinen seit mehr als 15 Jahre gehegten Wunsch und meine seit Jahren vorliegenden Pläne zur Vollautomatisierung der CO_2-Assimilationsmethodik und insbesondere der Küvettenkühlung im Interesse der pflanzenphysiologischen Forschung zu verwirklichen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft habe ich in gleichem Sinne zu danken für die Bereitstellung von Mitteln zur Einstellung meiner wissenschaftlichen Hilfskraft, Herrn Dr. Ensgraber, der mir mit Fleiß und Geschick bei der Zusammenstellung der Gesamtapparatur behilflich war. Weiterhin habe ich Herrn Dipl.-Ing. Lauer für seine stete Hilfsbereitschaft und Ratschläge herzlichst zu danken.

[1] Inzwischen ist es Huber u. Miller (1954) gelungen, die Transpiration im laufenden Luftstrom mit dem „Thermoflux" zu bestimmen.

Der gleiche Dank gilt auch den Herren Dir. Dr. GOLDMANN, Dr. ERNST, Dr. SIEVERT und Dr. HAAS von der BASF Ludwigshafen-Oppau für die Bereitstellung des Ultrarotabsorptionsschreibers und für die Einweisung in die Handhabung des Gerätes.

Das „Fliegende Laboratorium" und seine Einzelgeräte[1].

a) Der Ultrarotabsorptionsschreiber.

Eingehende Erklärungen über den „Uras" (U) abzugeben erübrigt sich, da dieses Gerät der BASF aus der Literatur (EGLE u. ERNST 1949, TRANQUILLINI 1952) hinlänglich bekannt ist. Es sollen an dieser Stelle daher nur einige Ausführungen gemacht werden über den von uns verwendeten Gasumschalter, die Trocknung der auf ihren CO_2-Gehalt zu untersuchenden Luft und die Temperaturabhängigkeit der Anzeige.

Die BASF konstruierte 2 verschiedene Gasumschalter für je 6 Meßstellen. Die erste Konstruktion sperrt jeweils 5 Meßstellen und läßt für die Zeit von 1 min nur eine einzige zum „Uras" durch. Das hat den Vorteil, daß bei nicht voller Ausnutzung des Sechsfarbenschreibers 2 oder 3 Meßstellen gekoppelt werden können, aber auch den Nachteil, daß für alle Meßstellen, die zur Zeit nicht über den „Uras" führen, jede für sich einer besonderen Pumpe angeschlossen werden muß, um die Durchspülung der Luftleitungen kontinuierlich durchführen zu können. Da nun die Luft die Pumpen hierbei passieren muß, diese aber nicht immer ganz dicht sind und durch angesaugte Nebenluft falsche CO_2-Werte anzeigen könnten, haben wir von dieser Konstruktion des Gasumschalters Abstand genommen und die zweite Form verwandt. Dieser *Gasumschalter* (G) ist im Gegensatz zur 1. Konstruktion mit 2 Absaugstutzen versehen. Der 1. Stutzen führt den Luftstrom von einer der 6 Meßstellen direkt zum „Uras", während der 2. Stutzen die 5 anderen Anschlüsse vereinigt, so daß deren Luftwege von einer einzigen, entsprechend leistungsfähigen Pumpe, für unsere Versuche auf 300 L/h reguliert, kontinuierlich durchgespült werden können. Diese Pumpe dient nur als Vorspülpumpe (SP). Die Luft wird, ohne analysiert zu werden, ins Freie geleitet. Die vom 1. Stutzen dem „Uras" zugeführte Luft wird der Analysenkammer durch eine hinter dem „Uras" geschaltete Pumpe (UP) zugeleitet und die Luftmenge, 60 L/h, mittels eines Rotameters (Ro) bestimmt. Die Menge der Vorspülluft wird mit einer kleinen Gasuhr bestimmt und die Strömungsgeschwindigkeit in beiden Systemen durch Tauchungen konstant gehalten.

Für die *Trocknung der Analysenluft* in der Gasleitung kommen in Frage: Silikagel, Schwefelsäure und Calciumchlorid. TRANQUILLINI (1952) benutzte Silikagel, und zwar zunächst in sehr voluminösen Trockentürmen,

[1] Die im Text beschriebenen Geräte und deren Schaltung in dem gesamten Aufbau der Apparatur sind in dem Schaltschema Abb. 6 aufgeführt.

die sich aber insofern von Nachteil erwiesen, als sich durch reversible Adsorption der CO_2 Anzeigeverzögerungen von $^1/_2$—$^3/_4$ Std herausstellten; auch bei Verwendung enger U-Rohre liegt der 1. Registrierpunkt nach Übergang zwischen 2 Eichgasen fast genau an der Stelle des folgenden. Die Entscheidung für eines der 3 Trockenmittel veranlaßte uns zu folgendem Versuch (Abb. 1).

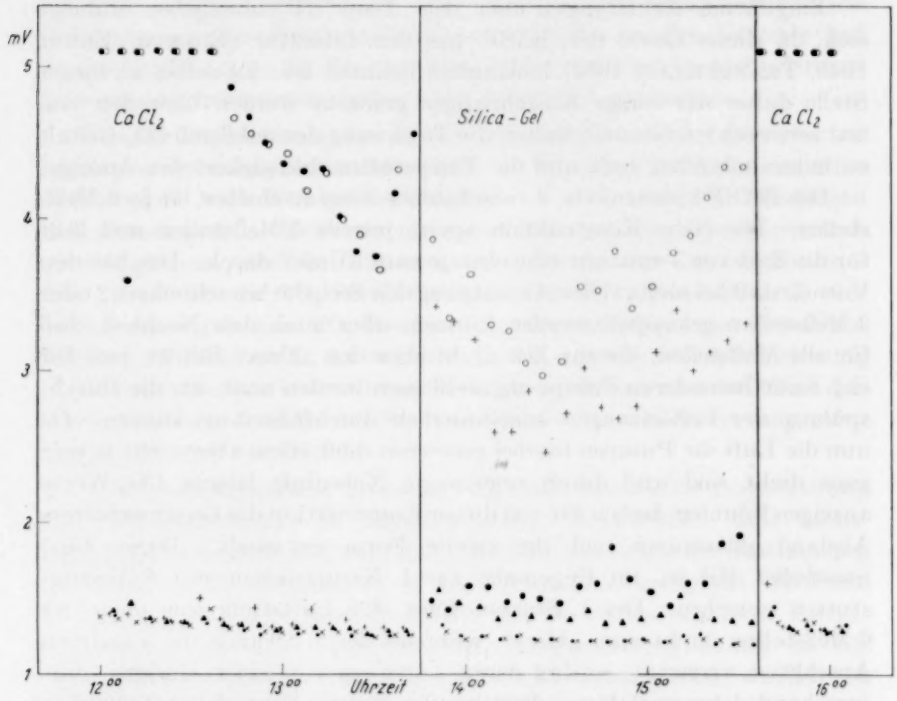


Abb. 1. Vergleichsversuch mit $Ca(Cl)_2$ und Silicagel als Trockenmittel. Meßstelle 1 = ●, 2 = ○, 3 = +, 4 = ▲, 5 = •, 6 = ×. Beschreibung s. S. 474—475.

Von 12^{00}—13^{46} Uhr wurde mit $CaCl_2$, von 13^{46}—15^{36} Uhr mit Silikagel (Merck) und anschließend wieder mit $CaCl_2$ getrocknet. Die Trockenmittel wurden im U-Rohre (Durchmesser 15 mm und 11 cm hoch) gefüllt und die Luftstromgeschwindigkeit auf 60 L/h konstant gehalten. Die Meßstellen 1 (●) und 2 (0) zeigen den CO_2-Gehalt der Zimmerluft und die Meßstellen (3 (+), 4 (▲), 5 (.) und 6 (×) die CO_2-Werte der Außenluft an. Zu Beginn des Versuches war die CO_2-Konzentration der Zimmerluft höher als 0,5%. Der Zeiger des Sechsfarbenschreibers schlug am Skalenende an; erst ab 12^{40} Uhr erschienen ablesbare Werte, die bei Berücksichtigung der CO_2-Schwankungen im Zimmer für die beiden Meßstellen recht gute Übereinstimmung zeigen. Nach dem Umschalten auf Silikagel ändert sich das Bild bis auf die Werte der Meßstellen 5

und 6 sehr wesentlich. Meßstelle 1 zeigt sofort nach dem Umschalten sehr tiefe Werte an, trotz der sehr CO_2-reichen Zimmerluft. Das Silikagel hat einen großen Anteil der CO_2 bis zu einem gewissen Sättigungsgrad während der Meßminute adsorbiert. Erst nach Einschalten der 2. Meßstelle geht der hohe CO_2-Anteil der Zimmerluft durch das Trockenrohr, aber auch hier wird noch ein Teil der CO_2 adsorbiert, verglichen mit der Anzeige bei der $CaCl_2$-Trocknung. Ab Meßstelle 3 (Außenluft) wird vom Silikagel wieder CO_2 freigegeben. Erst allmählich findet ein Ausgleich über die 4., 5. und 6. Meßstelle statt. Die 5. und die 6. Meßstelle zeigen dann wieder Werte an, die denen der Außenluft bei $CaCl_2$-Trocknung entsprechen. Mit Wiedereinschaltung der 1. Meßstelle nach 6 min wiederholt sich der beschriebene Vorgang im gleichen Sinne, so daß die 1. Meßstelle im 6 min-Cyclus viel zu tiefe, die 2. Meßstelle auch noch zu tiefe, die 3. Meßstelle viel zu hohe und auch noch die 4. Meßstelle zu hohe Werte bei Verwendung des Silikagels anzeigen. Bei Verwendung von $CaCl_2$ ab 15^{36} Uhr zeigen die Meßstellen 1 und 2 wieder die hohen CO_2-Werte der Zimmerluft bis zum Anschlag an das Skalenende an. Die reversible CO_2-Bindung an das $CaCl_2$ ist somit gleich 0 oder zumindest so gering, daß sie bei den Messungen der Außenluft gar nicht ins Gewicht fällt. *Die Versuche haben eindeutig erwiesen, daß von der Verwendung des Silikagels zugunsten des $CaCl_2$ Abstand genommen werden sollte.* Vergleichsversuche mit Schwefelsäure und $CaCl_2$ ergaben keine Unterschiede in der Anzeige. Bei Dauermessungen, und zwar selbst bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit reicht ein tägliches Auswechseln der $CaCl_2$-Röhrchen vollkommen aus, wenn die Luft nach dem Passieren der Assimilationskammer (K) oder unmittelbar hinter den Luftentnahmestellen für die Luft-CO_2-Bestimmung durch Schwefelsäure vorgetrocknet wurde (s. S. 477). Bei Einhaltung dieser Maßnahme wurde nach dem Wechsel des $CaCl_2$-Röhrchens nie eine Störung im Verlauf der CO_2-Kurven beobachtet; Störungen traten auch dann nicht auf, solange das $CaCl_2$ im aufsteigenden Schenkel des U-Rohres völlig trocken war und sich noch keine Flüssigkeit in der Biegung des Trockenrohres angesammelt hatte.

Wegen der Temperaturabhängigkeit der Anzeige wird für den „Uras" eine möglichst temperaturkonstante Unterbringung des Gerätes während der Messungen empfohlen. Diese Forderung ist im Freiland jedoch kaum zu erfüllen und eine übertriebene Sorge in dieser Hinsicht ist auch — wie Kontrollversuche ergaben — unbegründet. Am 14. zum 15. 8. 53 wurde bei einem Temperaturmaximum im „Fliegenden Laboratorium" von 34° C und einem Minimum von 19° C stündlich eine Eichung der Anzeige mit 2 Eichgasen durchgeführt. Die Konzentration der Eichgase war so eingestellt, daß ihre Meßpunkte auf der 5 mV-Skala des Sechsfarbenschreibers (S) einen Abstand von 2,65 mV = 0,0154%

CO_2 haben mußten. Als Ergebnis von 24 Eichungen ergab sich ein höchster Wert von 0,0161% und ein niedrigster Wert von 0,0151% CO_2. Diese Höchstdifferenz der Empfindlichkeit von nur 0,001% CO_2 wird auch von dem Gang des Nullpunktes nicht wesentlich überschritten, da der eine Eichgaswert nur Werte zwischen 0,0293 und 0,0307%, der andere solche zwischen 0,0449 und 0,0467% aufweist. Die Genauigkeit der Assimilations- und Atmungswerte, die hauptsächlich durch den Gang der Empfindlichkeit, und die Bestimmung des CO_2-Gehaltes der Luft, welche hauptsächlich durch den Gang des Nullpunktes bedingt ist, werden daher bei der Aufstellung des „Uras" im Freien kaum geringer. Wir haben während dieser Eichversuche einen Höchstwert der Außenluftkohlensäure von 0,0386% um 4 Uhr am 14. 8. 53 und einen Tiefstwert von 0,0276% um 14 Uhr am 15. 8. 53 bestimmt.

b) Die Küvette.

Die von uns verwendete Küvettenform ist den Größenverhältnissen des Rebblattes angepaßt und stellt eine bereits von Bosian (1933 S. 267) vorgeschlagene und nun auch verwirklichte Weiterentwicklung der von Schanderl und Bosian (1939) konstruierten Assimilationskammer dar. Sie ist aus 4 mm starkem Plexiglas gebaut und unterscheidet sich von den bisherigen Ausführungen vor allem durch die Auflage eines 10 mm starken Wassermantels auf der Oberseite der Küvette (Abb. 2).

Das Kühlwasser wird am spitzen Ende ein- und aus den beiden seitlichen Röhrchen über der Küvettenöffnung abgeleitet. Da der Luftstrom die entgegengesetzte Richtung nimmt, ist nach dem Gegenstromprinzip mit der besten Kühlwirkung zu rechnen, zumal die Küvette, der natürlichen Stellung des Rebblattes entsprechend, bei den Messungen gegen das spitze Ende geneigt aufgehängt wird.

Das Blatt wird beim Einbringen in die Küvette (K) zwischen einen doppelten Rost kräftiger Zwirnsfäden geschoben. Die Fäden haben den Zweck, das Blatt in allen Teilen möglichst in der Mitte der Küvette zu halten, so daß keine toten Lufträume entstehen und die Luft das Blatt allseitig umspülen kann. Zur Erleichterung des Einbringens des Blattes sind die Fäden des oberen Rostes nicht starr an der Küvette befestigt, sondern laufen durch die Löcher des Deckels nach einem Holzstäbchen, das nach dem Schließen des Deckels an der oberen Kante der Küvette zu liegen kommt, dabei die Fäden des oberen Rostes spannt und mit einem Gummiring in dieser Lage festgehalten wird[1].

Durch 2 Bohrungen seitlich des zugespitzten Teiles der Küvette wird ein Thermoelement (t_2) und ein Widerstandsthermometer (th_2) in den

[1] Die der Küvettenform sinnvoll angepaßte Konstruktion des Spannfädensystems ist nach Idee und Ausführung Herrn Dr. Ensgraber zuzuschreiben.

Luftraum der Küvette eingeführt. Beide Meßgeräte befinden sich durch teilweises Abdecken des zugespitzten Teiles der Küvette mit Silberpapier stets im Schatten. Von der Küvette aus führen Glas- bzw. Kunststoffleitungen (Norvin) zum „Uras". Sie können sehr lang sein, ohne daß dadurch die Leistung der Pumpen merklich abnimmt. Der Aktionsradius unserer Gesamtapparatur vom „Fliegenden Laboratorium" aus ist lediglich durch die Länge der Zuleitungen zu den Thermoelementen, Psychrometern und Photoelementen auf maximal 20 m beschränkt, kann aber durch entsprechende Verlängerung der Meßleitungen noch weitgehendst vergrößert werden. Die Atmungskohlensäure der Experimentierenden macht sich in der von uns gewählten Entfernung von 20 m nicht bemerkbar. Direkt hinter die Küvetten und Luftentnahmestellen sind zum Vortrocknen der Luft kleine Flaschen mit konzentrierter Schwefelsäure in die Leitungen eingeschaltet.

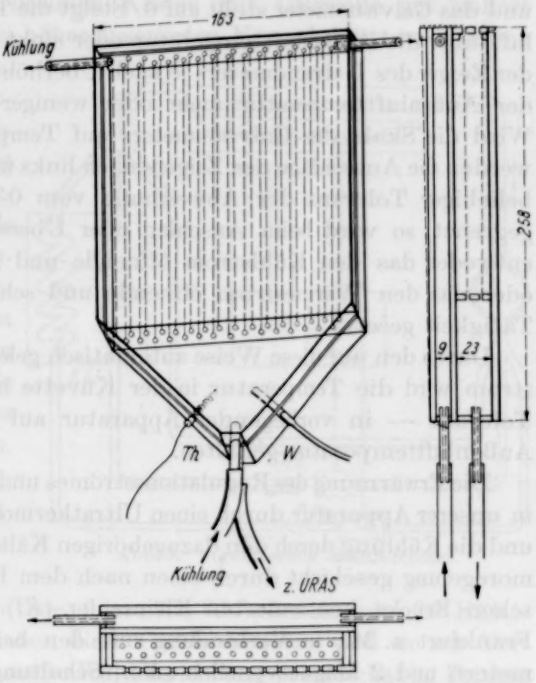


Abb. 2. Küvette mit Kühlmantel. *Th* Thermoelement, *W* Widerstandsthermometer. Beschreibung s. S. 476/477.

Das Einleitungsrohr reicht dabei knapp bis über die Oberfläche der Schwefelsäure. Zur Vermeidung zusätzlicher Leitungswiderstände soll das Rohr nicht in die Schwefelsäure eintauchen. Bei diesem Vorgehen sind niemals die sonst beträchtlichen und störenden Kondenswasserniederschläge in den Fernleitungen aufgetreten.

c) Die Küvettenkühlung.

Die Idee der Küvettenkühlung und deren Verwirklichung (Bosian 1933) ging von der Überlegung aus, einen Ausgleich der Küvetten- und Außenlufttemperatur durch vollautomatische Regulierung des Kühlwassers zu erreichen, und zwar so, daß die Überhitzung der Küvette durch Leitung von Kühlwasser und die Unterkühlung durch Leitung erwärmten Wassers im Kreislauf des Regulationsstromes durch den

Kühlmantel der Küvette bewirkt werden. Die automatische Steuerung des Regulationsstroms wurde nach dem Prinzip der Wheatstoneschen Brücke ermöglicht. Den konstanten Widerständen stehen 2 veränderliche (th_1 und th_2) gegenüber; th_1 in Exponierung zur Außenluft (Schatten) und th_2 für den Innenraum der Küvette. Ist die Küvettentemperatur gleich der Außenlufttemperatur, so wird die Brücke stromlos und das Galvanometer steht auf 0. Steigt die Temperatur der Küvettenluft über die Außenlufttemperatur oder sinkt sie unter diese, so weicht der Zeiger des Galvanometers je nach Überhöhung bzw. Unterschreitung der Außenlufttemperatur mehr oder weniger stark vom 0-Punkt ab. Wird die Skala des Galvanometers auf Temperaturgrade geeicht, und werden die Ausschläge des Zeigers nach links und rechts durch Kontakte beliebiger Toleranz der Abweichung vom 0-Punkt, z. B. $\pm 1^{\circ}$ C abgegrenzt, so wird beim Anschlag oder Überschreiten dieser Kontakte entweder das den Kühlstrom öffnende und schließende Magnetventil oder das den Wärmestrom öffnende und schließende Magnetventil in Tätigkeit gesetzt.

Durch den auf diese Weise automatisch gelenkten Kühl- und Wärmestrom wird die Temperatur in der Küvette im Bereich der gewählten Toleranz — in vorliegender Apparatur auf $\pm 1^{\circ}$ C — konstant zur Außenlufttemperatur gehalten.

Die Erwärmung des Regulationsstromes und dessen Kreislauf erfolgen in unserer Apparatur durch einen Ultrathermostaten nach Höppler (*H*) und die Kühlung durch den dazugehörigen Kältespeicher (*KS*). Die Thermoregelung geschieht durch einen nach dem Prinzip der Wheatstoneschen Brücke konstruierten Kleinregler (*Kl*) von Hartmann & Braun, Frankfurt a. M., in Verbindung mit den beiden Widerstandsthermometern und 2 Magnetventilen (*M*). Schaltung und Leitung des Regulationsstroms ist in der schematischen Abb. 6 angegeben. Im Schaltschema ist nur ein Magnetventil angegeben, es hat sich aber bei Mitverwendung des Höpplers als zweckmäßig erwiesen, ein zweites Magnetventil im Sinne obiger Beschreibung einzuschalten, da sonst ein Teil des erwärmten Wassers aus dem Höppler durch den Kältespeicher geleitet wird und der Eisverbrauch zu groß und die Trägheit der Regulierung nur unnötig erhöht wird. Die Widerstandsthermometer sind gegen Feuchtigkeit sehr empfindlich, ihre Lebensdauer kann aber erhöht werden, wenn sie luft- und wasserdicht konstruiert werden, so daß die in der Küvette auftretende sehr hohe Feuchtigkeit nicht in sie eindringen kann. In unserem Falle wurden die Widerstandsthermometer in einen Glasmantel eingeschmolzen.

In den Kühlkreisverlauf können gleichzeitig 2 Küvetten eingeschaltet werden. Für die Kühlung der beiden Küvetten reichen an einem mittleren Strahlungstage im allgemeinen 2 Stangen Eis aus. Die Verwendung von Trockeneis ist nicht zu empfehlen, da einmal die freiwerdende CO_2

die Standortsverhältnisse wesentlich ändern kann und zum anderen die Kühlwirkung mit Methanolkontakt zu hoch und ohne diesen zu gering sein würde und außerdem die Gefahr des Einfrierens für den Kältespeicher besteht, ganz abgesehen von den auf die Dauer zu hohen Kosten für die Trockeneiskühlung.

Es ist notwendig, den Höpplerthermostaten und den Kältespeicher, die beide in einem gemeinsamen Kasten mit Glaswolle gut isoliert untergebracht wurden, bei höher inserierten Versuchsblättern in Höhe der Küvette aufzustellen. Hin- und besonders Rücklaufschläuche der Kühlwasserleitungen dürfen nicht durchhängen, da die Verkittung des Wassermantels der Küvetten gegen Unter- und Überdruck sehr empfindlich ist. Die schmalen Seitenwände der Küvetten sollten aus diesem Grunde in ihrer Dicke nicht zu schwach gewählt werden, damit die großflächigen Böden und Decken der Küvette eine bessere Verkittungsgrundlage haben.

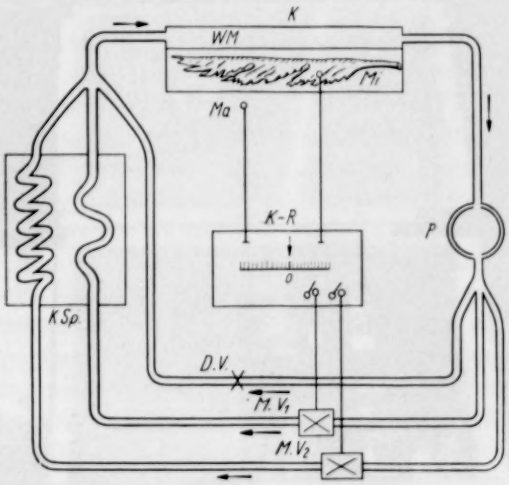


Abb. 3. Vereinfachter Kühlkreislauf.

Der Kleinregler ist sehr teuer (etwa 790 DM), der Höppler mit Kältespeicher ebenfalls. Wir haben diese Geräte benutzt, weil sie zur Verfügung standen und die gesamte Kühleinrichtung ja zunächst im Prinzip erprobt werden mußte. Für die Neukonstruktion der Kühleinrichtung wird folgende, wesentlich preiswertere Konstruktion vorgeschlagen (Bosian): Der Höppler mit seiner großen Wassermenge, deren Aufheizung kostspielig ist und die Trägheit des Systems nur unnötig erhöht, kann durch eine einfache Heizspirale und eine einfache Umwälzpumpe mit kleinem Motor ersetzt werden, ja, es kann selbst die nur bei Überkühlung in Funktion tretende Heizung und damit die Heizspirale vermieden werden, wenn durch Verwendung der beiden Magnetventile und zwei verschieden langer Kühlschlangen die Kühlung in 2 Stufen durchgeführt wird. Ebenso könnte der Kleinregler durch eine billigere Konstruktion ersetzt und durch die Einsparungen ein Kühlaggregat zur Vermeidung des häufigen Eiswechsels im Kältespeicher beschafft werden[1].

[1] Dieser vereinfachte und verbilligte Kühlkreislauf (Abb. 3) ist für den Anschluß an die Netz- und Stromleitung als selbständige Apparatur vorgesehen und befindet sich im Bau.

d) Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeitsregistrierung.

Geldmangel und lange Lieferfristen nötigten uns, von der an sich bequemeren Verwendung eines zweiten Sechsfarbenschreibers Abstand zu nehmen und zwei kontinuierlich und vollautomatisch registrierende Geräte (*Gv*) zu verwenden, die unseren Wünschen und Belangen entsprechend im Meteorologischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe zusammengestellt und gebaut wurden[1] (Abb. 4).

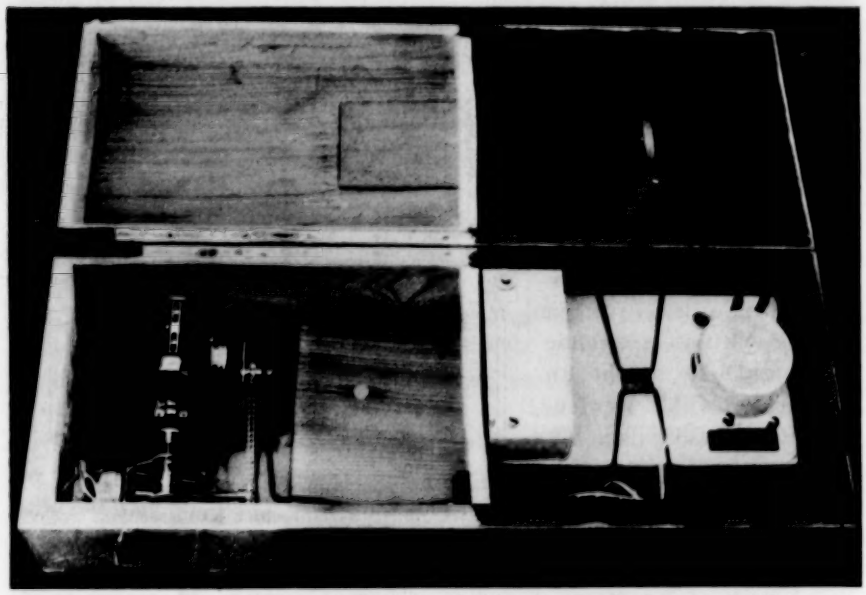


Abb. 4. Galvanometer mit Registriereinrichtung. Beschreibung s. S. 480.

In einem lichtdicht verschließbaren Kasten ist ein Lichtstrichgalvanometer (Lange, Berlin-Steglitz) untergebracht. Links befindet sich die Registriereinrichtung. Ein Synchronmotor schiebt über ein kleines Übersetzungsgetriebe den Film in der Kamera je Stunde um 2 cm weiter. Gleichzeitig rotiert vor dem Objektiv der Kamera eine Blechscheibe mit einer Umdrehung je Minute und dazu mit gleicher Geschwindigkeit ein Kunststoffrädchen, das alle 30 sec zwei elektrische Kontakte auseinanderdrückt und sie nach 25 sec für 5 sec wieder zusammenfallen läßt. In der Blechscheibe sind zwei gegenüberliegende Sektoren von etwa 45° herausgeschnitten. Befindet sich einer dieser

[1] Herrn Prof. Dr. Diem, T.-H. Karlsruhe, und Herrn Reg.-Rat Burkhardt, Wetteramt Neustadt, gebührt unser aufrichtiger Dank für die vielen technischen Hinweise und Ratschläge zur vollautomatischen Registrierung meteorologischer Daten.

beiden Sektoren gerade vor dem geöffneten Kameraverschluß, so fällt der durch einen schmalen Schlitz an der Galvanometerskala oben und unten abgeblendete Lichtstrich als Punkt auf den Film. Hat die Blechscheibe beim Weiterdrehen gerade das Objektiv wieder völlig abgedeckt, so berühren sich die beiden elektrischen Kontakte an der Kunststoffscheibe und schließen damit einen 6 V 10 A-Stromkreis, der am Schaltkasten die nächste Meßstelle einschaltet. Der Schaltkasten (*Sch*) gestattet die automatische Einschaltung 5 verschiedener Meßstellen, von denen jede einzelne alle 3 min auf dem Film durch einen Lichtpunkt registriert wird. In gleicher Weise wird der Nullpunkt registriert, so daß insgesamt 6 Meßpunkte in Abständen von 30 sec aufgezeichnet werden. Bei Ingangsetzen der Registriereinrichtung wird der Verschluß der Kamera gespannt und nach dem Verschließen des Kastens mittels eines Drahtauslösers dauernd offengehalten. Die Zeitmarken werden manuell in Übereinstimmung mit den auf dem Urasstreifen angegebenen Zeiten durch einen senkrecht über die Filmbreite verlaufenden Lichtstrich gekennzeichnet. Als Filmmaterial wird Isopan ISS verwandt; ein Streifen von 60 cm reicht für eine ganze Tagesregistrierung aus.

Die Auswertung der Filme erfolgt durch Projektion derselben auf ein vorbereitetes Millimeterpapier mit der Gradeinteilung der Galvanometerskala. Die Vergrößerung wird so gewählt, daß eine bequeme Ablesung der einzelnen, in 30 sec-Abständen aufeinanderfolgenden Meßpunkte des Films möglich ist. Die Nullpunktkurven der Filme werden mit der des Millimeterpapiers in Deckung gebracht, die entsprechenden Werte der Licht- und Temperaturaufzeichnungen auf dem Millimeterpapier abgelesen und in Tabellen bzw. Kurven festgelegt.

Wenn diese Auswertung der Filme auch etwas mühsamer ist als die bei einem Sechsfarbenschreiber, so vereinigt unsere vollautomatische Registriereinrichtung für thermoelektrische Messungen doch in sich die Vorteile der geringeren Kosten, geringster Trägheit und der geringeren Transport- und Stoßempfindlichkeit. Das sind Vorteile, die für Freilandversuche mit häufigem Standortwechsel von erheblicher Bedeutung sind.

Die passiven Lötstellen der Thermoelemente sind in einer großen Thermosflasche (*Th*) von 12 cm Innendurchmesser untergebracht. Die Drähte müssen dabei etwa 30 cm in die Thermosflasche eintauchen, damit der Einfluß der Außentemperatur ausgeschaltet bleibt. Die passiven Lötstellen (*P*) sind aus dem gleichen Grunde tief in die Thermosflasche eingeführt und sind, damit sie absolut gleichmäßige Temperaturkonstanz untereinander haben, außerdem in einer mit Paraffinöl gefüllten Glasröhre untergebracht. Die Quecksilberkugel eines Kontrollthermometers muß sich in möglichster Nähe der Lötstellen befinden. Die Konstanthaltung der Temperatur in der Thermosflasche erfolgt durch einen Bimetallregler (*R*). Die einstellbare Temperatur soll 5 oder mehr

Grad über der zu erwartenden Tageshöchsttemperatur liegen. Der Regler ist mit 2 Heizwiderständen ausgestattet, dem noch ein kleinerer, direkt unterhalb der Bimetallspirale liegender Widerstand parallel geschaltet ist. Beim Einschalten der Heizung durch den Regler wird durch den kleineren Widerstand die Spirale sofort bevorzugt aufgeheizt, bevor die Wärmewelle aus den weiter entfernt angebrachten großen Widerständen auf die Spirale einwirken kann. Dadurch wird der Strom so

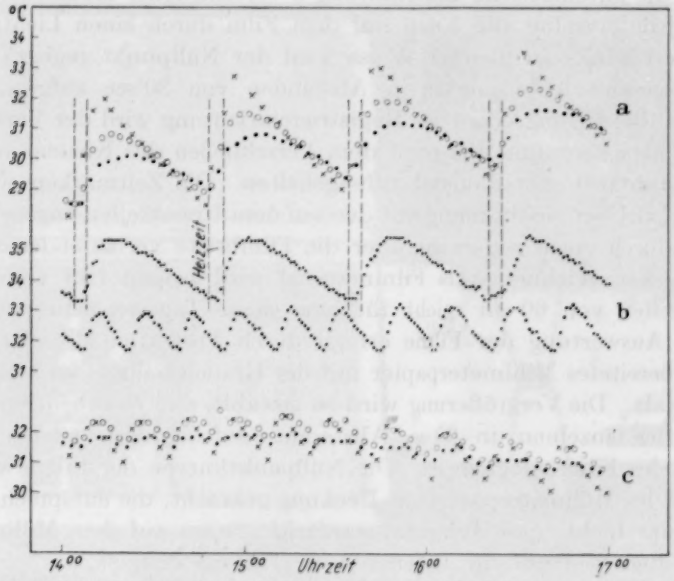


Abb. 5. Vergleichsversuch zwischen Bimetallregler und Kontaktthermometerrelaisschaltung zur Konstanthaltung der Temperatur der passiven Lötstelle in der Thermosflasche. Beschreibung s. S. 482.

frühzeitig unterbrochen, daß die dann noch von den großen Heizern nachgelieferte Wärme zu keiner allzu großen Erwärmung des Gefäßinnern führen kann.

Die Eignung des von uns verwandten Bimetallreglers geht aus den in Abb. 5 aufgezeichneten Vergleichskurven mit einer einfachen Kontaktthermometerrelaisschaltung eindeutig hervor.

Die beiden bei b aufgezeichneten Kurven geben einminütliche Ablesungen der in das Innere der Thermosflaschen eingeführten Quecksilberthermometer wieder. Die untere entspricht dem Temperaturgang des Bimetallreglers, die obere dem der einfachen Kontaktthermometerrelaisschaltung. Der Unterschied der Schaltperioden beider Messungen (20 und 50 min) und der geringere Ausschlag (1,3° C gegenüber 2° C) sprechen eindeutig für die genauere und schnellere Temperaturregelung des Bimetallreglers gegenüber der einfachen Kontaktthermometerschaltung.

Die kurzfristigen Schwankungen der Kurven des Bimetallreglers wirken sich auf die Temperatur der passiven Lötstellen nicht aus, da diese mit einer dreifachen Umhüllung von Kunststoffschläuchen versehen sind und alle zusammen — bei unseren Messungen in einer Thermosflasche meist 8 — nochmals fest in Watte eingepackt wurden. Beim Eindringen in diese 4fache Umhüllung sind die Temperaturschwankungen längst zu einem statistischen Mittelwert ausgeglichen, was aber, wie die Erfahrung lehrte, bei der langfristigen Schaltung und den langwelligen Perioden der Kontaktthermometerschaltung nicht der Fall ist.

Die Kurven bei a und c wurden mit Thermoelementen gewonnen, und zwar die a-Kurven in der Deckelnähe der Thermosflasche und die

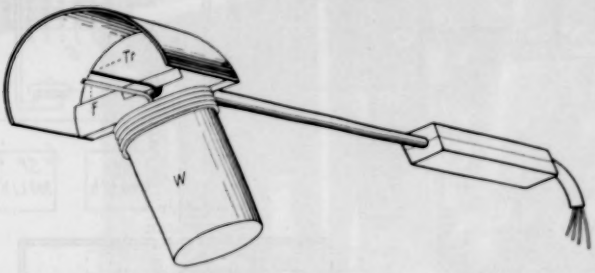


Abb. 6. Unventiliertes Psychrometer nach DIEM. *F* feuchtes, *Tr* trockenes Thermoelement, *W* Wasserreservoir.

b-Kurven in Höhe der passiven Lötstellen. Der Gang der Kurven rechtfertigt die obige Forderung, die Thermoelemente und deren Lötstellen möglichst tief in der Thermosflasche unterzubringen.

Nach dem in der Thermosflasche erreichten Temperaturmittelwert wird dann der Nullpunkt des Galvanometers eingestellt. Der Ausschlag erfolgt proportional der Differenz zwischen passiver und aktiver Lötstelle, wobei der Widerstand der Thermoelemente (10 Ohm) und der des Galvanometers mit der Skala so abgeglichen sind, daß die Einstellung des Lichtstriches auf der Skala eine direkte Temperaturablesung erlaubt, wenn die Pole des Thermoelementes am Galvanometer im richtigen Sinne geschaltet sind.

Die *Lichtregistrierung* erfolgt in ähnlicher Weise mittels des Galvanometers. Die verwendeten Photoelemente (Ph) sind durch Shuntung und Abdeckung mit Graufiltern so abgeglichen, daß der höchste Ausschlag bei vollem Tageslicht nicht über die Skalenbreite des Galvanometers hinausgeht. Die Ausschläge müssen nach einer vorbereiteten Eichkurve auf absolute Werte umgerechnet werden.

Die automatische *Registrierung der relativen Feuchtigkeit* erfolgt ebenfalls mittels des Lichtstrichgalvanometers, und zwar in Verbindung mit dem thermoelektrischen Psychrometer von DIEM (1953) (Abb. 6).

Zur vollautomatischen *Bestimmung der Windgeschwindigkeit* verwenden wir einen Anemohodographen mit Fernleitung zum Schalenkreuzwindmesser.

Die Zusammenwirkung aller beschriebenen Geräte ist aus der schematischen Darstellung in Abb. 7 zu entnehmen. Luftführende Leitungen

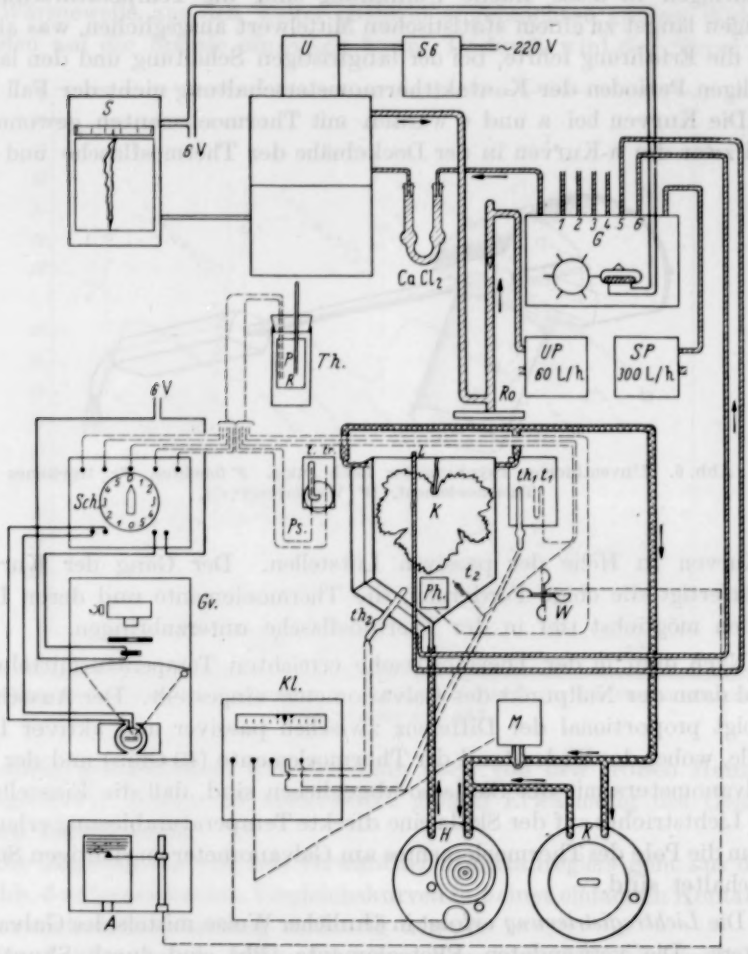


Abb. 7. Schaltschema der Gesamtanlage. Beschreibung s. S. 484.

sind durch einfache Schraffur, Kühlwasserleitungen durch Kreuzschraffur angegeben und die Fernleitungen der Thermoelemente von der Küvette zu den Registriergeräten, desgleichen die zum und vom Kleinregler (*Kl*) zur Küvette und Kühleinrichtung wurden durch unterbrochene Linien kenntlich gemacht. Im Schema sind oben der „Uras"

mit den zugehörigen Hilfsgeräten, in der Mitte rechts die Meßstelle mit der Küvette (*K*), unten rechts die Kühleinrichtung (*H*, *M*, *KS*), Mitte rechts ein Lichtstrichgalvanometer (*Gv*) mit Schaltkasten (*Sch*) und schließlich unten links der Kleinregler (*Kl*) und das Registriergerät zum Kontaktanemometer (*A*) eingezeichnet.

e) Das „Fliegende Laboratorium".

Alle genannten und beschriebenen Geräte sind in einem eigens für Freilanduntersuchungen gebauten Einachsenanhänger von 1,80 m Länge,

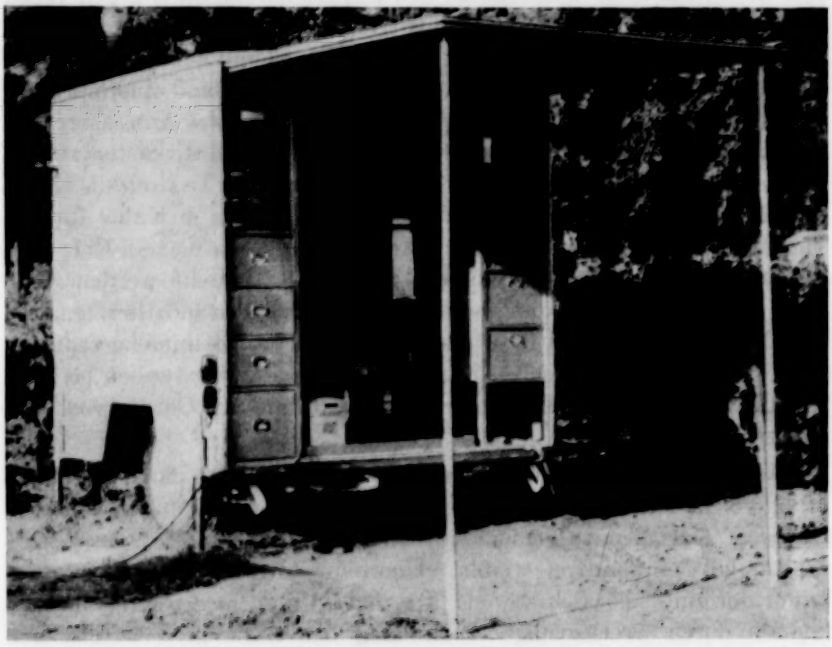


Abb. 8. Das Fliegende Laboratorium.

Breite und Höhe untergebracht (Abb. 8). Der Anhänger kann durch 4 herablaßbare Stützen ins Lot gestellt werden. Nach dem Aufbau der Küvetten, der klimatologischen Meßgeräte und der Kühleinrichtung am Standort der Versuchspflanze und dem Legen der Strom- und Luftleitungen vom Standort zum „Fliegenden Laboratorium" erfolgt die Einschaltung, Bedienung und Überwachung der vollautomatischen Registrierungen von einem Schaltbrett im Anhänger aus. Ein 200 m langes Kabel stellt die Verbindung mit dem Stromnetz her und der Stromverbrauch kann auf einem Zähler kontrolliert werden.

Die empfindlichen Geräte sind entweder federnd aufgehängt (Uras mit Sechsfarbenschreiber, Gasumschalter usw.) bzw. auf Schwammgummi stehend gegen Stöße beim Standortwechsel abgesichert. Das

Fahrgestell selbst ist mit einer guten Drehstahlfederung versehen. Bei einer Fahrgeschwindigkeit von 20 km/h und wiederholtem Einsatz bei Freilandversuchen haben wir nie Beschädigungen an den Geräten zu verzeichnen gehabt.

Durch eine zweiteilige Flügeltür auf der Vorderseite und durch eine nach oben aufklappbare große Tür auf der ganzen Rückseite des Anhängers und eine Seitenklappe sind die Geräte bequem zugänglich gemacht. Die aufklappbare Tür der Rückseite kann durch 2 Stangen abgestützt werden, dient als Dach für ein kubisches Anbauzelt von 1,80 m² Grundfläche und schützt den Experimentierenden gegen Wind und Regen. Die Bedienung der Geräte erfolgt von diesem „Laboratoriumraum" aus. Seitlich im Anhänger angebrachte Schubfächer und Kästen dienen zur Aufnahme der für das Arbeiten im Freiland unerläßlichen Utensilien und Werkzeuge. Von der Seitenklappe des Anhängers aus sind die beiden registrierenden Galvanometer mit Schaltkästen zu bedienen. Im Vorderraum können während des Standortwechsels die Kühleinrichtung, 200 m Netzkabel (auf einer Trommel), die Kabel für die Thermoelemente, Eichgasflaschen für den „Uras", Stative, ein Ruhebett für den Nachtdienst, ein Feldstuhl usw. untergebracht werden. Die 20 m langen Kabel für die Thermoelemente, Widerstandsthermometer und Photoelemente sind in Kunststoffschläuchen zusammengefaßt, so daß ein leichtes und schnelles, sauberes Auslegen der Leitungen bis zum Standort der Versuchspflanzen erfolgen kann und ein Gewirr von Leitungen vermieden wird.

Das „Fliegende Laboratorium" hat sich selbst bei einem Wolkenbruch von 50 mm Niederschlag in $^1/_2$ Std als zweckmäßig und zuverlässig erwiesen. Der gesamte Versuchsaufbau arbeitete während dieser Witterungsunbill einwandfrei weiter. Übertemperaturen im „Fliegenden Laboratorium", die sich störend auf den „Uras" auswirken könnten, können durch zweckmäßige Aufstellung des Anhängers, Öffnen der Türen und durch Einschalten eines Ventilators weitgehendst vermieden werden.

Vergleichsversuche mit vollautomatischer Küvettenkühlung und ungekühlter Küvette.

Die Wirkung der Kühleinrichtung und deren Notwendigkeit für den Verfolg des Assimilationsverlaufs und des CO_2-Haushaltes allgemein ist aus Abb. 9 eindeutig erkennbar.

Die beiden unteren Kurven geben den Tagesgang der Außenlufttemperatur (Ta) und den der gekühlten Küvettenlufttemperatur (Tg) wieder. Die Kühlung wurde gegen 9 Uhr in Betrieb gesetzt. Das Einspielen der Kühlung war gegen 10 Uhr erfolgt, so daß die Küvettenlufttemperatur im weiteren Verlauf mit geringen Schwankungen

auf ± 1 bis 2° C ausgeglichen wurde[1]. Die darüberliegenden beiden Assimilationskurven zeigen den Einfluß der Kühlung auf den Assimilationsverlauf. Das Blatt in der gekühlten Küvette (*Ass. g,*) gibt das typische Bild einer Maximumkurve in guter Übereinstimmung

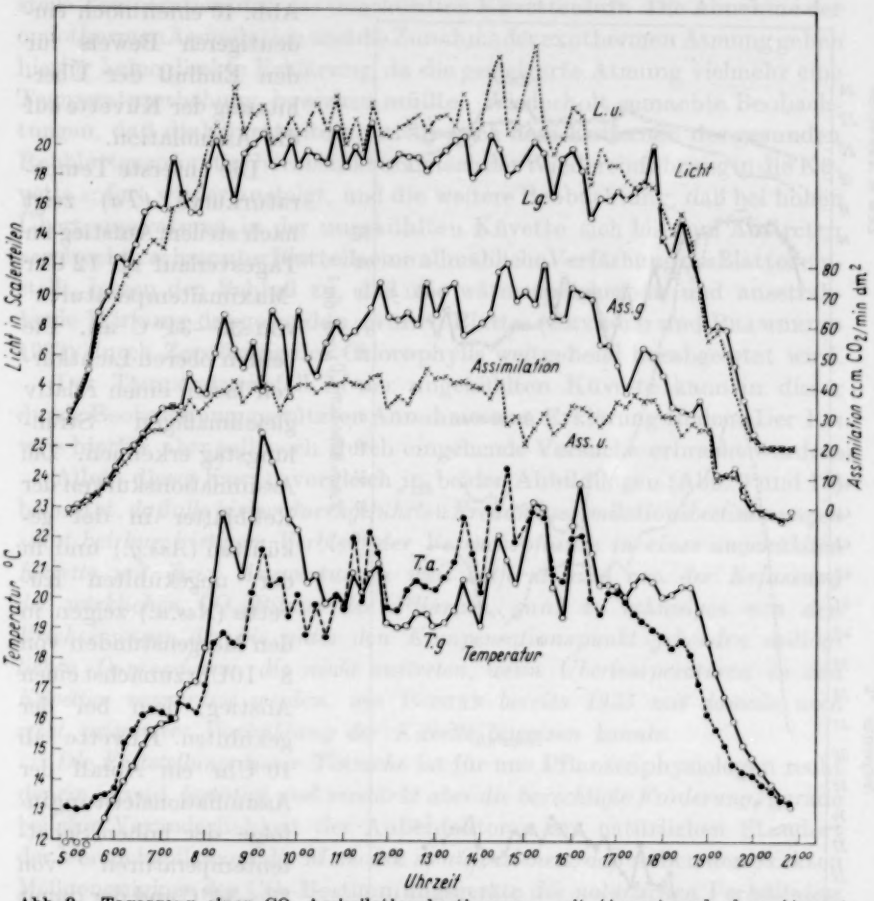


Abb. 9. Tagesgang einer CO_2-Assimilationsbestimmung mit (Ass.g.) und ohne (Ass.u.) Küvettenkühlung. Beschreibung s. S. 486—488.

mit dem Verlauf der Lichtkurven wieder, während das Blatt in der ungekühlten Küvette (Ass. u.) bereits bei etwa 19—20° C Außenlufttemperatur einen abgeflachten Kurvenverlauf und von 14 bis 16 Uhr eine deutliche Depression bei Temperaturen von 20—24° C anzeigt. Der Einfluß der Übertemperatur in der Küvette gegenüber der Außenluft ist unverkennbar und ebenso der regulierende Einfluß der Küvetten-

[1] Die Genauigkeit der Regelung beträgt jetzt ± 1° C und weniger und die Einspielung der Kühlung erfolgt heute wesentlich schneller.

kühlung. Die Tagesassimilation liegt nahezu doppelt so hoch wie bei der ungekühlten Küvette.

Zeigte schon Abb. 9, daß bei Außenlufttemperaturen von 19—20° C die Assimilationswerte bei ungekühlter Küvette zu tief liegen, so gibt Abb. 10 einen noch eindeutigeren Beweis für den Einfluß der Überhitzung der Küvette auf die Assimilation.

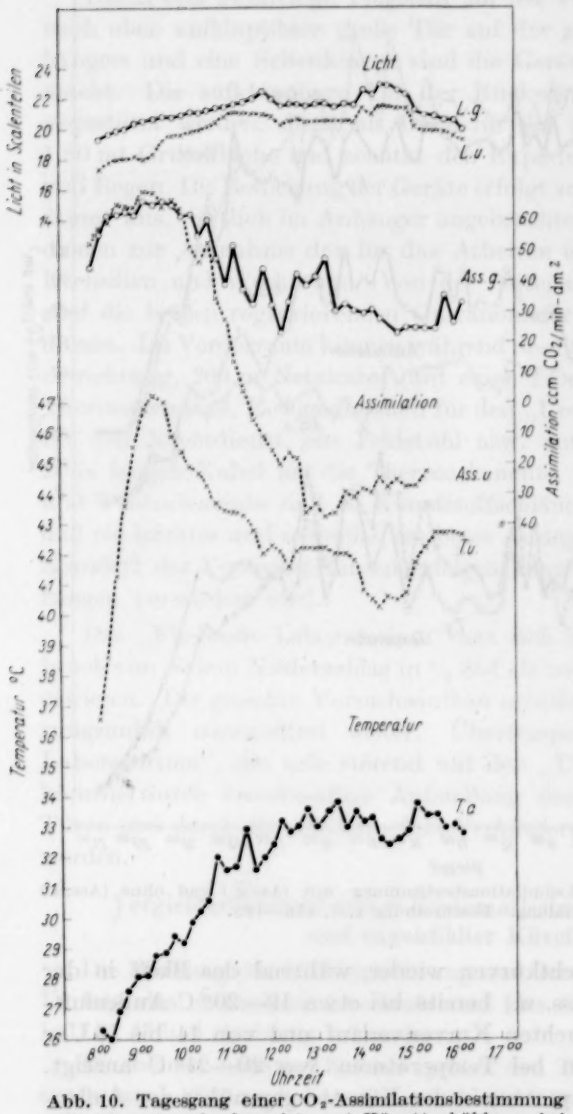


Abb. 10. Tagesgang einer CO_2-Assimilationsbestimmung mit (*Ass.g.*) und ohne (*Ass.u.*) Küvettenkühlung bei extremer Temperatur. Beschreibung s. S. 488/489.

Die unterste Temperaturkurve (*Ta*) zeigt nach steilem Aufstieg im Tagesverlauf ab 12 Uhr Maximaltemperaturen von 33—34° C an. Die beiden oberen Lichtkurven lassen einen relativ gleichmäßigen Strahlungstag erkennen. Die Assimilationskurven der Rebblätter in der gekühlten (*Ass.g.*) und in der ungekühlten Küvette (*Ass.u.*) zeigen in den Morgenstunden von 8—10 Uhr zunächst einen Anstieg, dem bei der gekühlten Küvette ab 10 Uhr ein Abfall der Assimilationsleistung infolge der hohen Schattentemperaturen von 33—34° C und der damit bedingten überhöhten Blattemperatur folgt. Die Assimilationswerte aber bleiben auch während der Zeit maximaler Temperaturen immer noch positiv, während die Assimilationskurve des Blattes in der ungekühlten Küvette (*Ass.u.*) ab 10 Uhr steil abfällt, 11^{30} Uhr bereits die Kompensationslinie überschreitet und dann nur noch erhebliche Atmungswerte bis zum Abbruch des Versuchs um 15 Uhr anzeigt. Das Blatt war verfärbt

und wies große Verbrennungsflächen auf. Dieser steile Abfall findet seine Erklärung in der Übertemperatur in der ungekühlten Küvette, die um 9 Uhr bereits 47° C erreicht hatte und bis 15 Uhr nicht unter 40° C absank.

Überraschend wirkt zunächst der mit der Assimilationskurve gehende steile Temperaturabfall der ungekühlten Küvettenluft. Die Abnahme der endothermen Assimilation und die Zunahme der exothermen Atmung geben hierfür keine direkte Erklärung, da die gesteigerte Atmung vielmehr eine Temperaturerhöhung bewirken müßte. Wiederholt gemachte Beobachtungen, daß die Küvettentemperatur nach dem Entfernen des gesunden Rebblattes sofort tief herabsinkt und nach der Wiedereinführung in die Küvette sofort wieder ansteigt, und die weitere Beobachtung, daß bei hohen Übertemperaturen in der ungekühlten Küvette sich bis zum Auftreten regelrecht verbrannter Blatteile eine allmähliche Verfärbung des Blattes einstellt, lassen den Schluß zu, daß die wärmespeichernde und ausstrahlende Wirkung des gesunden, grünen Blattes (Seybold und Brambring 1933) durch Zerstörung des Chlorophylls weitgehend herabgesetzt wird.

Der Temperaturabfall in der ungekühlten Küvette kann in dieser durch Beobachtung gestützten Annahme eine Erklärung finden. Der Beweis hierfür aber soll noch durch eingehende Versuche erbracht werden.

Allein dieser Kurvenvergleich in beiden Abbildungen (Abb. 9 und 10) bedeutet, *daß alle bisher durchgeführten Freilandassimilationsbestimmungen selbst bei kurzfristigem Verbleib der Versuchspflanze in einer ungekühlten Küvette mit ihren Auswertungen weit entfernt sind von der Erfassung der wirklichen CO_2-Bilanz der Pflanzen, ganz zu schweigen von den Erscheinungen der bis unter den Kompensationspunkt gehenden mittäglichen Depressionen, die nicht auftreten, wenn Übertemperaturen in den Küvetten vermieden werden, wie* Bosian *bereits 1933 mit damals noch recht primitiver Vorkühlung der Küvette beweisen konnte.*

Die Feststellung dieser Tatsache ist für uns Pflanzenphysiologen recht deprimierend, *bestätigt und verstärkt aber die berechtigte Forderung*, gerade bei der Veränderlichkeit der Außenfaktoren am natürlichen Standort der Versuchspflanzen *die Methodik so aufzuziehen, daß* neben der exakten Meßgenauigkeit der CO_2-Bestimmungsgeräte *die natürlichen Verhältnisse in der Küvette soweit wie möglich gewahrt bleiben.*

Die hier beschriebene Kühlvorrichtung entspricht dem wichtigsten Teil dieser Forderung: *Die vollautomatische Konstanthaltung der Küvettenluft- mit der Außenlufttemperatur darf als weitgehend gelöst betrachtet werden und gestattet damit exaktere Bestimmungen des CO_2-Haushaltes unter weitgehender Angleichung an die natürlichen Verhältnisse und den unbeschadeten Verbleib der Versuchspflanze in der Küvette auf theoretisch unbegrenzte Zeit!*

Weitere Verbesserungsvorschläge für die Regulierung des Küvettenklimas.

Mit der Regulierung der Küvettentemperatur und deren Angleichung an die Temperatur der Außenluft wird die durch „Glashauswirkung" bedingte Überhöhung der Blattemperatur gegenüber der Blattemperatur im Freien sehr wahrscheinlich noch nicht restlos ausgeglichen, sondern nur stark herabgemindert und dadurch in tragbaren Grenzen gehalten.

Leider unterblieben durch besondere Umstände die Vergleichsbestimmungen der Blattemperaturen innerhalb und außerhalb der Küvette, so daß ein Vergleich mit den von Tranquillini (1954) angestellten Untersuchungen bedauerlicherweise an dieser Stelle noch nicht gezogen werden kann. Das hier beschriebene System der Küvettenkühlung ist aber durchaus geeignet, durch Anbringung von Widerstandsthermometern an Blättern innerhalb und außerhalb der Küvette die Kühlung der Küvette vollautomatisch so zu regulieren, daß auch die Blattemperaturen aufeinander abgestimmt werden. Außerdem kann — einer, aus einer persönlichen Unterhaltung mit dem Meteorologen Dr. Weise, Würzburg, gezogenen Anregung folgend — durch Einbau eines kleinen Ventilators in der Küvette ein schnellerer Wärmeausgleich zwischen Blattoberfläche und Kühlmanteltemperatur erreicht werden, der ebenfalls einer Angleichung der Blattemperatur in der Küvette an die Blattemperatur im Freien entgegenkommt.

Der Entwurf für die Konstruktion einer kombiniert vollautomatisch gekühlten und ventilierten Küvette liegt bereits vor. Die Bekanntgabe soll aber in Verbindung mit darauf abgestellten Versuchen einer besonderen Veröffentlichung vorbehalten bleiben (Bosian).

Die Lichtverhältnisse in der Küvette können durch entsprechende Wahl des Küvettenmaterials in optimalen Grenzen für die Pflanze gehalten werden, problematisch aber ist vorläufig noch die automatische Registrierung und Angleichung der relativen Feuchtigkeit in der Küvette zur relativen Feuchtigkeit der Außenluft und ebenso die *gleichzeitige* Bestimmung der Assimilation und Transpiration in dem aus der Küvette abgeleiteten Luftstrom mittels der Psychrometer, es sei denn, daß auf die natürliche relative Feuchte in dem der Assimilationsküvette zugeführten Luftstrom durch Vortrocknung verzichtet wird. Diese Konzession aber schafft ein überhöhtes Dampfdruckgefälle vom Versuchsblatt zur Küvettenluft und damit eine Verfälschung der reellen Transpirationswerte. Der vorläufig einzig erkennbare, aber auch der noch mit großen Vorbehalten behaftete Weg zur kontinuierlichen Transpirationsbestimmung eines Blattes in situ im Luftstrom wäre der, unter Verzicht auf die gleichzeitige Assimilationsbestimmung mit einem sehr starken Luftstrom (besonders bei großen Blättern) den transpirierten Wasserdampf aus der auf Außenverhältnisse abgestimmten, blattgekühlten Küvette abzusaugen, einem registrierenden Feuchtigkeitsmeßgerät auf kürzestem Weg zuzuführen und die Transpiration aus der Differenz zur relativen Feuchtigkeit der Außenluft zu bestimmen.

Nach Abschluß des Manuskriptes erfuhr ich aus den Ber. d. D.B.G., daß Huber und Miller (1954) das Problem der Wasserdampf- und Transpirationsregistrierung im laufenden Luftstrom mit Hilfe des von der BASF entwickelten „Thermoflux" gelöst haben. Meßergebnisse wurden jedoch von R. Miller erst nach Abschluß der Vegetationsperiode in Aussicht gestellt. Das ist ein erfreulicher Ausblick auf zukünftige Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Pflanzen. Ich (Bosian) hege jedoch — trotz der mit dem „Thermoflux" ermöglichten hohen Meßgenauigkeit für Wasserdampfbestimmungen — Zweifel an der Möglichkeit zur Bestimmung natürlicher Transpirationswerte, bevor nicht das Problem des Küvettenklimas auch unter dem Gesichtspunkt

der Transpirationsbestimmung gelöst ist. Das gilt besonders für den verständlichen und durchaus wünschenswerten Versuch, die Assimilation und die Transpiration im gleichen Luftstrom bestimmbar zu machen.

Das wichtigste Problem für physiologische Freilanduntersuchungen über den CO_2- und Wasserhaushalt der Pflanzen ist vorläufig — trotz der in vorliegender Veröffentlichung beschriebenen, exakte Werte anzeigenden Meßgeräte und des „Thermoflux" mit seinen Nebeneinrichtungen — *immer noch das Küvettenklima.*

Zusammenfassung.

1. Bedeutung und Notwendigkeit der vollautomatischen Messung und Registrierung der CO_2-Assimilationsbestimmungen und der dazugehörigen klimatologischen Nebenmessungen bei Freilanduntersuchungen wurden herausgestellt und begründet.

2. In Versuchen wurde unter Beweis gestellt, daß, bei Unterlassung der Küvettenkühlung, alle bisher in Freilandversuchen über den CO_2-Gaswechsel der Pflanzen, insbesondere die bei hohen Temperaturen und starker Sonnenstrahlung gewonnenen Ergebnisse einer grundsätzlichen Korrektur bedürfen, da sie zu tiefe, durch Überhitzung der Küvetten bedingte Assimilationswerte anzeigen und mittägliche zum Teil erheblich unter die Kompensationslinie gehende Depressionen im Kurvenverlauf angeben, die in vorliegenden Versuchen selbst bei Lufttemperaturen von 33—34° C im Schatten nicht auftraten.

Der Beweis wurde mit ungekühlten und vollautomatisch regulierten, wassergekühlten Küvetten in Vergleichsversuchen geführt und damit die bereits 1933 (Bosian S. 267) vertretene Begründung für das Auftreten der starken mittäglichen Atmungswerte erneut bestätigt und die ebenfalls damals vorgeschlagene Notwendigkeit der Küvettenkühlung als unumgänglich nachgewiesen.

3. Ein „Fliegendes Laboratorium" wurde beschrieben für Freilandversuche am natürlichen Standort der Versuchspflanze, und zwar für langfristige Untersuchungen von Pflanzenteilen im natürlichen Verband mit der Pflanze. Die Gesamtapparatur gestattet die vollautomatische Messung und Registrierung von 6 CO_2-Bestimmungen in Abständen von je 1 min, 10 Messungen in 30 sec-Abständen (Temperatur, Licht, relative Feuchte), außerdem die Registrierung der Windgeschwindigkeit und die vollautomatische Küvettenkühlung.

4. Die Küvette und deren vollautomatische Kühlung wurde beschrieben. Die Kühlung kann so reguliert werden, daß die Küvettenlufttemperatur auf die der Außenluft mit einer Toleranz von $\pm$ 1° C abgestimmt und konstant gehalten bleibt.

5. Für die Angleichung der überhöhten Blattemperatur in der Küvette an die der Außenluftblattemperatur ist eine weitere Verbesserung der gekühlten Küvette vorgesehen dahingehend, daß durch den Einbau eines Luftumwälzers ein schnellerer Temperaturausgleich von der Blattoberfläche zum Kühlmantel erreicht wird.

6. Die Angleichung der relativen Feuchtigkeit in der Küvette mit Pflanze an die der Außenluft ist vorläufig noch nicht möglich, ebenso die gleichzeitige Bestimmung der Assimilation und der Transpiration in dem aus der Küvette abgeleiteten Luftstrom.

7. Das wichtigste Problem für physiologische Freilanduntersuchungen über den CO_2- und Wasserhaushalt der Pflanze bleibt vorläufig noch das Küvettenklima.

Literatur.

Bosian, G.: Assimilations- und Transpirationsbestimmungen an Pflanzen des Zentralkaiserstuhls. Z. Bot. **26**, 209 (1933). — Über die Vollautomatisierung der CO_2-Assimilationsbestimmung. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 35 (1953). — Diem, M.: Feuchtemessung mit Hilfe thermoelektrischer Psychrometer. Arch. Meteorol., Geophys. u. Bioklimat. **5**, 59 (1953). — Egle, K., u. A. Ernst: Die Verwendung des Ultrarotabsorptionsschreibers für die vollautomatische und fortlaufende CO_2-Analyse bei Assimilations- und Atmungsmessungen bei Pflanzen. Z. Naturforsch. **4b**, 351 (1949). — Egle, K., u. W. Schenk: Der Einfluß der Temperatur auf die Lage des CO_2-Kompensationspunktes. Planta (Berl.) **43**, 83 (1953). — Harder, R., P. Filzer u. A. Lorenz: Über Versuche zur Bestimmung der Kohlensäureassimilation immergrüner Wüstenpflanzen während der Trockenzeit in Beni Unif (Alger. Sahara). Jb. wiss. Bot. **75**, 45 (1931). — Harder, R., Elis. Keppler u. Hedwig Reuss: Beobachtungen über das Pflanzenwachstum und die Kohlensäureassimilation bei Kohlensäuredüngung und nächtlicher Zusatzbeleuchtung. Gartenbauwiss. **5**, 389 (1931). — Henrici, M.: Chlorophyllgehalt und Kohlensäureassimilation bei Alpen- und Ebenen-Pflanzen. Verh. naturforsch. Ges. Basel **30**, 43 (1918). — Hiramatsu, Keinosuke: On the daily progress of carbon assimilation in the shadow under natural conditions. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., IV. Ser. Biology **7**, 239 (1932). — Huber, B., u. R. Miller: Methoden zur Wasserdampf- und Transpirationsregistrierung im laufenden Luftstrom. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 222 (1954). — Jaccard, P.: Variations de l'anhydride carbonique au voisinage de la végétation à l'air libre et en milieu confiné. Bull. Soc. Chim. biol. Paris **12**, 156 (1930). — Kostytschew, S., u. V. Berg: Untersuchungen über den Tagesverlauf der Photosynthese in Transkaukasien (Küstenregionen des Schwarzen Meeres). Planta (Berlin) **11**, **144** (1930). — Kostytschew, S., u. Mitarb.: Der tägliche Verlauf der Photosynthese bei Landpflanzen. Planta (Berl.) **1**, 679 (1926). — Paauw, F. van der: The indirect action of external factors on photosynthesis. Recueil Trav. bot. néerl. **29**, 497 (1932). — Schanderl, H.: Ökologische und physiologische Untersuchungen an der Wellen- und Muschelkalkflora des Maintals zwischen Würzburg und Gambach. Planta (Berl.) **10**, 756 (1930). — Untersuchungen über die Photosynthese einiger Rebsorten, speziell des Rieslings, unter natürlichen Verhältnissen. Wiss. Arch. Landwirtsch., Abt. A **3**, 529 (1930). — Schanderl, H., u. G. Bosian: Über einige Verbesserungen an der CO_2-Bestimmungsapparatur nach Holdheide-Huber-Stocker. Ber. dtsch. bot. Ges. **57**, 75 (1939). — Schoder, Annemarie: Über die Beziehungen des Tagesganges der Kohlensäureassimilation von Freilandpflanzen zu den Tagesfaktoren. Jb. wiss. Bot. **74**, **441** (1932). — Seybold, A., u. F. Brambring: Über die thermischen Eigenschaften der Laubblätter. I. Planta (Berl.) **20**, 201 (1933). — Tranquillini, W.: Der Ultrarot-Absorptionsschreiber im Dienste ökologischer Messungen des pflanzlichen CO_2-Umsatzes. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 102 (1952). — Über den Einfluß von Übertemperaturen der Blätter bei Daueinschluß in Küvetten auf die ökologische CO_2-Assimilationsmessung. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 191 (1954).

Dr. G. Bosian, Landes- Lehr- und Forschungsanstalt für Wein- und Gartenbau, Neustadt a. d. Weinstraße.

Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis

Herausgegeben von **H. Mayer-Kaupp**, Heidelberg.

Zweiter Band: **Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie**
Eine Anleitung zur Ausführung von Absorptions-, Emissions-, Fluoreszenz-, Streuungs-, Trübungs- und Reflexionsmessungen. Von **Gustav Kortüm.** Dritte neubearbeitete Auflage. Mit 186 Abbildungen. VIII, 458 Seiten 8°. 1955. Ganzleinen DM 36.—

Inhaltsübersicht: Allgemeine Grundlagen. — Hilfsmittel für optische Untersuchungen. — Visuelle Methoden. — Lichtelektrische Methoden. — Thermoelektrische Methoden. — Photographische Methoden. — Anwendungsbeispiele. — Sachverzeichnis.

Fortschritte der chemischen Forschung

Herausgegeben von **F. G. Fischer**, Würzburg, **H. W. Kohlschütter**, Darmstadt, **Kl. Schäfer**, Heidelberg. Schriftleitung: **H. Mayer-Kaupp**, Heidelberg.
III. Band, 2. Heft. Mit 14 Textabbildungen. 224 Seiten Gr.-8°. 1955. DM 28.80

Inhaltsübersicht: **Hyperkonjugation.** Von F. Becker. — **Über die Verwendung von Komplexon in der Maßanalyse.** Von H. Flaschka. — **Some Recent Developments in Thiophene Chemistry.** By F. F. Nord, A. Vaitiekunas and Louis J. Owen. — **Fortschritte der Azulenchemie seit 1950,** Von W. Treibs, W. Kirchhof und W. Ziegenbein.
Die Fortschritte erscheinen zwanglos in einzeln berechneten Heften, von denen je vier zu einem Band vereinigt werden.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Moderne Methoden der Pflanzenanalyse

Herausgegeben von **K. Paech,** Tübingen, **M. V. Tracey,** Rothamsted.
In 4 Bänden. Jeder Band ist einzeln käuflich.

Modern Methods of Plant Analysis

Edited by **K. Paech,** Tübingen, **M. V. Tracey,** Rothamsted.
In 4 Volumes. Each volume is sold separately.

Im Juni 1955 wird erscheinen:

Dritter Band:

Bearbeitet von H. M. Benedict, D. D. Clarke, H. Erdtman, K. Freudenberg, T. A. Geissman, T. W. Goodwin, O. Hoffmann-Ostenhof, H. Holtzem, E. Jucker, P. Larsen, O. Moritz, F. F. Nord, R. F. Phipers, W. Schmid, O. Th. Schmidt, F. A. Skinner, M. Steiner, G. de Stevens, A. Stoll.

Mit 77 Abbildungen. Etwa 790 Seiten Gr.-8°. 1955

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen Ganzleinen DM 110.40

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen Ganzleinen DM 138.—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes gilt der Vorbestellpreis auch nach Erscheinen des zweiten Bandes weiter als Subskriptionspreis.

Inhaltsübersicht: Die niederen Terpene (ätherische Öle und Harze allgemein). Von Prof. Dr. O. Moritz, Institut für Pharmakognosie der Universität Kiel. — Pyrethrins and Allied Compounds. By Dr. R. F. Phipers, The Cooper Technical Bureau, Berkhamsted, Herts., Great Britain. — Triterpene und Triterpen-Saponine. Von Prof. Dr. M. Steiner und Dr. H. Holtzem, Pharmakognostisches Institut der Universität Bonn. — Phytosterine, Steroidsaponine und Herzglykoside. Von Prof. Dr. A. Stoll und Dr. E. Jucker, Chemische Fabrik Sandoz, Basel. — Carotenoids. By Dr. T. W. Goodwin, Biochemistry Department, Johnston Laboratories, the University, Liverpool, Great Britain. — The Determination of Rubber and Gutta in Plants. By Dr. H. M. Benedict, Stanford Research Institute, Stanford, California, USA. — Simple Benzene Derivatives. By Dr. D. D. Clarke and Prof. F. F. Nord, Department of Organic Chemistry and Enzymology, Fordham University, New York, USA. — Natural Tropolones. By Prof. Dr. H. Erdtman, Institutionen för Organisk Kemi, Kungl. Tekniska Högskolan, Stockholm, Schweden. — Ein- und zweikernige Chinone. Von Privatdozent Dr. O. Hoffmann-Ostenhof, I. Chemisches Laboratorium der Universität Wien. — Natural Phenylpropane Derivatives. By Dr. G. de Stevens and Prof. F. F. Nord, Department of Organic Chemistry and Enzymology, Fordham University, New York, USA. — Lignans. By Prof. Dr. H. Erdtman, Institutionen för Organisk Kemi, Kungl. Tekniska Högskolan, Stockholm, Schweden. — Anthocyanins, Chalcones, Aurones, Flavones and Related Water-Soluble Plant Pigments. By Professor Dr. T. A. Geissman, Department of Chemistry, University of California, Los Angeles, USA. — Lignin. Von Prof. Dr. K. Freudenberg, Chemisches Institut der Universität Heidelberg. — Natürliche Gerbstoffe. Von Prof. Dr. O. Th. Schmidt, Chemisches Institut der Universität Heidelberg. — Anthraglykoside und Dianthrone. Von Prof. Dr. W. Schmid, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen. — Growth Substances in Higher Plants. By Docent Dr. P. Larsen, Det Botaniske Laboratorium, Universitetet Bergen, Norwegen. — Antibiotics. By Dr. F. A. Skinner, Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts., Great Britain.

Im Dezember 1954 erschien:

Zweiter Band. Mit 48 Abbildungen. XIII, 626 Seiten Gr.-8°. 1955.
Ganzleinen DM 110.—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches Subskriptionspreis
Ganzleinen DM 88.—

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, und ein Prospekt des Springer-Verlages, Wien, bei.

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany.